



Spy49_1658c eine Genregion unbekannter Funktion in *Streptococcus*
pyogenes M49 mit virulenz-relevanten Eigenschaften

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität Rostock

vorgelegt von

Regina Arlt

aus Weimar

geb. am 30.08.1980 in Görlitz

Gutachter

1. Gutachter:

Prof. Dr. rer. nat. Bernd Kreikemeyer

Institut für Med. Mikrobiologie, Virologien und Hygiene; Universität Rostock

2. Gutachter:

Prof. Dr. rer. nat. Hubert Bahl

Institut für Biowissenschaften Mikrobiologie; Universität Rostock

3. Gutachter:

Prof. Dr. rer. nat. Reinhard Schröder

Institut für Biowissenschaften Genetik; Universität Rostock

Datum der Einreichung: 12.02.2015

Datum der Verteidigung: 19.10.2015

Für meine beiden Männer.

*Phantasie ist wichtiger als Wissen,
denn Wissen ist begrenzt.*

Albert Einstein

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Dr. Andreas Podbielski für die Bereitstellung des interessanten Forschungsthemas. Mein besonderer Dank gilt auch Herrn Prof. Bernd Kreikemeyer für seine stets offene Tür und seine hilfreichen Ratschlägen.

Herrn Prof. Hubert Bahl möchte ich für die Erstellung des Zweitgutachtens und seinen konstruktiven Hinweisen danken.

Dr. Dirk Koczan und seinen Mitarbeitern danke ich für die Hilfestellung bei den Sequenzanalysen.

Den Mitarbeitern der AG Kreikemeyer danke ich für die Unterstützung und die gute Stimmung im Labor. Ganz besonders möchte ich an dieser Stelle Nadja Patenge für ihre Geduld und Ausdauer bei der Korrektur meiner Dissertation danken. Aber auch Tomas Fiedler, Sylvio Redanz, Yvonne Humboldt und Jana Normann sage ich Danke Danke Danke.

Nicht vergessen möchte ich alle ehemaligen Mitarbeiter der AG Kreikemeyer. Sie kennengelernt zu haben, war eine Bereicherung sowohl in privater als auch in beruflicher Hinsicht. Ein dicker Dank geht deshalb an Venelina Sugareva, Catur Riani, Nikolai Siemens, Silvio Hering und Antje Sieg.

Meiner Familie, meinen Eltern, Schwiegereltern und Freunden danke ich für ihr Verständnis und ihre Unterstützung während der Anfertigung dieser Arbeit.

Zusammenfassung

Streptococcus pyogenes ist ein weltweit verbreiteter humanpathogener Organismus, welcher für ein breit gefächertes Spektrum an unterschiedlichen Krankheitsbildern verantwortlich ist. Dazu zählen sowohl oberflächliche Hauterkrankungen als auch lebensbedrohliche invasiv-toxische Infekte. Zum Überleben und zur Ausbreitung im menschlichen Wirt entwickelte *S. pyogenes* unter anderem effektive Mechanismen zur Abwehr von oxidativem Stress und antimikrobiellen Peptiden (AMPs). Um neue Erkenntnisse über diese molekularen Abwehrmechanismen zu erlangen, wurden umfangreiche Mutantenbanken in den Stämmen M18 MGAS8232 und M49 591 generiert. In Serotyp M18 wurden mehr als 7400 und in Serotyp M49 6700 Tn*Spc* Insertionsmutanten isoliert, was einer Genomabdeckung von ca. 3,9 bzw. 3,7 entsprach. Die anschließende Selektion unter oxidativem Stress führte in beiden Serotypen zur Identifizierung von Genprodukten für metabolische Prozesse, zur DNA-Synthese bzw. zur Reparatur von DNA Schäden, intergenischen Bereichen und von Genen mit bislang unbekannter Funktion. In mehreren Mutanten des Serotyps M49 erfolgte die Insertion von Tn*Spc* innerhalb einer Genregion mit unbekannter Funktion, *Spy49_1658c*. Untersuchungen mittels RT-PCR erbrachten den Nachweis eines polycistronischen Transkriptes, bestehend aus *Spy49_1658c* und *Spy49_1659c*.

Spy49_1658c::TnSpc Stämme sowie die isogene *Spy49_1658c*-Deletionsmutante Δ *Spy49_1658c* waren durch eine verstärkte Toleranz gegenüber Menadion (MS) auf Agarplatten gekennzeichnet, wenn die Platten mit Zellen aus stationären Kulturen beimpft wurden. Bei Δ *Spy49_1658c* ließ sich dieser Phänotyp auch mit Kulturen aus der exponentiellen Wachstumsphase beobachten. Auf das Toleranzverhalten gegenüber H₂O₂ und dem AMP Colistin hatte die Inaktivierung von *Spy49_1658c* keinen Einfluss. Eine *in-silico* Analyse der Proteinsequenz von *Spy49_1658c* identifizierte ein Permease-Motiv und in *Spy49_1659c* ein N-Acetyl-Muramoyl-L-Alanin-Amidase-Motiv. Die Aminosäureverbrauchsdaten des WT und der *Spy49_1658c::TnSpc* Stämme weisen auf eine Beteiligung von *Spy49_1658c* beim Export von Glutaminsäure hin. Zusätzlich zeigte die Deletionsmutante Δ *Spy49_1658c* eine signifikant verringerte Oberflächenhydrophobizität im Vergleich zum WT M49 591. Genregion *Spy49_1658c* bis *Spy49_1659c* ist aus diesen Gründen vermutlich an strukturellen Umbauprozessen in der Zellwand involviert, welche die extrazelluläre Verfügbarkeit von Glutaminsäure und somit auch die Oberflächenhydrophobizität beeinflussten.

Untersuchungen zum Virulenzverhalten von $\Delta Spy49_1658c$ konnten eine Reduktion des Adhärenzpotentials an humane Keratinozyten der Linie HaCaT („Human adult low Calcium high Temperature Keratinocytes“) sowie eine verstärkte Wachstumshemmung u./o. Abtötung von $\Delta Spy49_1658c$ durch HaCaT belegen. In humanem Vollblut wurde das Vermehrungspotential von *S. pyogenes* M49 durch den Verlust von *Spy49_1658c* dramatisch vermindert. Diese Ergebnisse bestärken die Annahme von Modifikationen innerhalb der bakteriellen Zellwand, welche sich auf den Adhäsinanteil insgesamt oder eventuell nur auf einzelne Adhäsine auswirkten.

Phagozytoseassays mit murinen Monozyten/Makrophagen J774A.1 konnten jedoch keinen Unterschied in der Phagozytose- oder Abtötungsrate von WT und $\Delta Spy49_1658c$ aufzeigen. Obgleich die Inaktivierung von *Spy49_1658c* zu einer erhöhten Toleranz gegenüber des Superoxidanionen Bildners Menadion führte, konnte M49 dem toxischen Zusammenspiel von reaktiven Sauerstoffspezies („reactive oxidative species“, ROS) und AMPs innerhalb Phagolysosomen nichts entgegensetzen.

Mit Hilfe des Transposonelements *TnSpc* gelang es umfangreiche Mutantenbanken in zwei Serotypen von *S. pyogenes* zu generieren. Diese ermöglichen es unter Bedingungen ähnlich einer *S. pyogenes*-Infektion nach Mutanten mit charakteristischen Eigenschaften zu suchen und zu selektieren. In weiterführenden Experimenten kann der Phänotyp sowie der Genotyp der selektierten Insertionsmutanten im Detail analysiert werden, was zur Identifizierung neuer Genregionen mit Virulenz relevanten Eigenschaften führen kann.

Abstract

Streptococcus pyogenes is a widespread human pathogen that causes different infection patterns. These include mild superficial skin infections as well as life-threatening systemic infections. For the survival and spreading inside the human host the organism had to develop effective strategies to resist oxidative stress and antimicrobial peptides (AMPs). Large-scale mutant libraries of *S. pyogenes* strain M18 8232 and strain M49 591 were generated by transposon mutagenesis to gain new information about these defense mechanisms. In serotype M18 more than 7400 and in serotype M49 approximately 6700 Tn*Spc* insertional mutants could be isolated corresponding to a 3.9-fold or a 3.7-fold genome coverage, respectively. Subsequently, mutants with an altered susceptibility to oxidative stress were selected and the transposon insertion site was analysed. This led to the identification of genes encoding for proteins involved in metabolic processes, for the synthesis and repair of DNA as well as for genes with unknown functions and intergenic regions. For serotyp M49 multiple transposon mutants had a Tn*Spc* insertion in the gene region *Spy49_1658c* with unknown function. RT-PCR confirmed a polycistronic transcript spanning gene region *Spy49_1658c* to *Spy49_1659c*. Growth experiments on agar plates supplemented with various oxidative substances revealed an increased tolerance to menadione (MS) of stationary cultures of the isolated *Spy49_1658c::TnSpc* mutants and an isogenic Δ *Spy49_1658c* strain. Additionally, this phenotype was observed in exponentially growing cells from strain Δ *Spy49_1658c*. The inactivation of *Spy49_1658c* did not affect the susceptibility to H₂O₂ and the AMP Colistin. *In-silico* analyses of the deduced amino acid sequence of *Spy49_1658c* identified a motif for a permease function and in *Spy49_1659c* a motif for a N-acetyl-muramoyl-L-alanine amidase function. Aminoacid consumption rates of the wildtype strain and the *Spy49_1658c::TnSpc* strains indicated a contribution of *Spy49_1658c* to export processes of glutamic acid. Probably gene region *Spy49_1658c* to *Spy49_1659c* is involved in reconstructive processes of the bacterial cell wall that also influence the content of extracellular glutamic acid. A significant reduction of the surface hydrophobicity of Δ *Spy49_1658c* confirmed the hypothesis of alterations in the bacterial cell wall composition of the mutant strain.

Experiments with human keratinocytes HaCaT showed a reduced capacity of Δ *Spy49_1658c* to adhere to HaCaT compared to the wild type strain. Furthermore, in the presence of HaCaT the rate of mortification or rate of growth inhibition of Δ *Spy49_1658c* was increased compared to the wild type strain. Growth experiments in human blood revealed a significantly

reduced growth rate of *S. pyogenes* M49 due to the loss of *Spy49_1658c*. All these results strengthen the assumption of modifications of the bacterial cell wall composition which affected the content of adhesins altogether or only of certain adhesins.

However, in experiments with murine monocytes/macrophages J774A.1 the amount of phagocytized and/or killed wildtype and $\Delta Spy49_1658c$ cells was the same. Even though the inactivation or deletion of *Spy49_1658* increased the tolerance to superoxide anions ($O_2^{\cdot-}$) produced by menadione the strain $\Delta Spy49_1658c$ was not able to withstand the combined effect of reactive oxidative species (ROS) and AMPs inside phagolysosomes.

By using transposon mutagenesis large-scale mutant libraries were generated in two different serotypes of *S. pyogenes*. These libraries represent a useful tool to select mutants with virulence associated phenotypes under conditions similar to a *S. pyogenes* infection. In additional experiments the phenotype as well as the genotype of the selected mutants can be analysed in more detail. The obtained information can help to identify new relevant gene regions for the virulence of *S. pyogenes*.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	VI

1. Einleitung	1
1.1. Die Diversität von <i>Streptococcus pyogenes</i>	1
1.2. Besiedlungs- und Ausbreitungsbarrieren für <i>S. pyogenes</i>	2
1.2.1. ROS und AMPs zur Abwehr pathogener Organismen	3
1.3. Virulenzfaktoren von <i>S. pyogenes</i> zur Besiedlung des Menschen	5
1.3.1. Kompensationsmechanismen gegenüber oxidativem Stress	7
1.4. Transposonsystem Tn <i>Spc</i>	8
1.5. Ziel dieser Studie	10
2. Material und Methoden	11
2.1. Prokaryotische Stämme und Plasmide	11
2.1.1. Prokaryotische Stämme	11
2.1.2. Plasmidkonstrukte	11
2.2. Eukaryotische Zelllinien	11
2.3. Nährmedien und Puffer	12
2.4. Bakterienanzucht	13
2.4.1. Vorkultivierung von <i>S. pyogenes</i>	13
2.4.2. Generierung von Tn <i>Spc</i> -Mutantenbanken	13
2.4.3. Bestimmung Wachstumskinetiken	14
2.4.4. Kultivierung von <i>E. coli</i>	14
2.5. Anzucht und Passagierung eukaryotischer Zelllinien	15
2.5.1. Murine Makrophagen-Monozyten-Zelllinie J774A.1	15
2.5.2. Humane Keratinozyten-Linie HaCaT	15
2.6. Molekularbiologische Methoden	16
2.6.1. Präparation genomischer DNA (gDNA) aus <i>S. pyogenes</i>	16
2.6.1.1. Isolierung von gDNA nach Martin <i>et al.</i>	16
2.6.1.2. DNA-Extraktion mittel DNeasy Blood and Tissue Kit von Qiagen	17
2.6.2. RNA-Isolierung aus <i>S. pyogenes</i>	18
2.6.3. Plasmid-Isolierung aus <i>E. coli</i>	18

2.6.4. Modifikation von DNA mittels Restriktionsendonukleasen	19
2.6.5. Alkoholische Fällung von DNA.....	19
2.6.6. Quantifizierung von Nukleinsäuren	20
2.6.7. Primersequenzen	20
2.6.8. PCR und Gelelektrophorese	22
2.6.8.1. Amplifikation spezifischer DNA-Bereiche	22
2.6.8.2. Elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten	23
2.6.8.3. Herstellung von Agarosegelen	23
2.6.8.4. <i>emm</i> -Typisierung nach CDC-Norm	24
2.6.8.5. Synthese von DNA-Sonden	24
2.6.8.6. Kolonie-PCR bei <i>E. coli</i>	24
2.6.8.7. Nachweis rekombinanter Sequenzen in <i>S. pyogenes</i>	24
2.6.8.8. Aufreinigung von PCR-Produkten	25
2.6.9. Ligation von DNA-Fragmenten	25
2.6.10. Dephosphorylierung von Vektor-DNA mit Hilfe alkalischer Phosphatase	25
2.6.11. Transformation kompetenter <i>E. coli</i> mit Plasmid-DNA	26
2.6.11.1. Herstellung kompetenter <i>E.coli</i>	26
2.6.11.2. Hitzeschocktransformation.....	26
2.6.12. Elektroporation von GAS.....	27
2.7. Identifizierung Tn <i>Spc</i> -Insertionsstellen	28
2.7.1. Dye Terminator PCR.....	28
2.7.2. „SiteFinding“-PCR nach Tan <i>et al.</i> (2005)	28
2.8. Genotypisierung mittels Southern- /Northern-Blot Analysen und RT-PCR.....	31
2.8.1 Auftrennung Gesamt-DNA	31
2.8.2. RNA-Gelelektrophorese.....	32
2.8.3. Kapillarblotverfahren zum Transfer von DNA-Fragmenten.....	32
2.8.4. Übertragung von RNA mittels Vakuumblot	32
2.8.5. Fixierung gebundener Nukleinsäuren an Nylon-Membranen.....	32
2.8.6. Sonden-Hybridisierung und Detektion.....	33
2.8.7. RT-PCR.....	34
2.9. Virulenz-relevante Phänotyp-Analysen	34
2.9.1. Selektion von Tn <i>Spc</i> -Mutanten auf oxidativen und AMP-Stress	34
2.9.1.1. Bestätigung beobachteter Phänotypen	35

2.9.1.2. Bestimmung Überlebensraten in Gegenwart von H ₂ O ₂ , Menadion und Colistin	35
2.9.2. Physiologische Charakterisierung von <i>Spy49_1658c::TnSpc</i> und Δ <i>Spy49_1658c</i>	36
2.9.2.1. Bestimmung Verbrauchsdaten essentieller Aminosäuren	36
2.9.2.2. Vergleich Wachstumsverhalten in THY, CDM und DMEM+GlutaMAX™	37
2.9.3. Bestimmung der Oberflächenhydrophobizität	37
2.9.4. Wachstumsverhalten unter oxidativen und AMP-Stress.....	38
2.9.5. Phagozytoseassay mit J774A.1 Monozyten-Makrophagen	38
2.9.6. Adhäsions-/Invasionseffizienz von <i>S. pyogenes</i> an/in HaCaT-Keratinocyten.....	40
2.9.7. Bestimmung der Überlebensraten in Vollblut.....	42
2.10. In-Silico Analysen von <i>Spy49_1658c</i> und <i>Spy49_1659c</i>	42
2.10.1. Sequenzvergleiche sowie Identifikation potentieller Motive.....	43
2.10.2. Identifizierung potentielle Promotor- und Terminatorstrukturen.....	43
2.11. Statistische Auswertung	43
3. Ergebnisse	44
3.1. Charakterisierung Transposonsystem <i>TnSpc</i>	44
3.2. Generierung Mutantenbanken und Selektion virulenzrelevanter Mutanten.....	45
3.2.1. Aufbau <i>TnSpc</i> -Mutantenbanken in <i>S. pyogenes</i> M18 und M49	45
3.2.2. Selektion virulenzrelevanter <i>TnSpc</i> -Mutanten.....	46
3.2.3. Weiterführende Geno- und Phänotypisierung.....	50
3.2.3.1. Southern-Blot Analyse zur Bestimmung der Anzahl integrierter <i>TnSpc</i> - Elemente.....	50
3.2.3.2. Verändertes Wachstumsverhalten von <i>TnSpc</i> -Stämmen auf unterschiedlichen Stressmedien.....	53
3.2.3.3. Lokalisation von <i>TnSpc</i> -Insertionsstellen ausgewählter M18:: <i>TnSpc</i> und M49:: <i>TnSpc</i> Stämme.....	59
3.3. Bestätigung Genotyp der <i>Spy49_1658c::TnSpc</i> Mutanten 32H3, 68C8 und 90C11	61
3.4. In-Silico Analyse von Genregion <i>Spy49_1658c</i> bis <i>Spy49_1659c</i>	65
3.4.1. Vorhersagen möglicher Promotoren und Terminatoren.....	65
3.4.2. Funktionellen Proteindomänen sowie Struktur von <i>Spy49_1658c</i> und <i>Spy49_1659c</i>	67
3.5. Bestätigung eines polycistronischen Transkriptes von <i>Spy49_1658c</i> und <i>Spy49_1659c</i>	68
3.6. Generierung einer <i>Spy49_1658c</i> Deletionsmutante in M49 591	69

3.6.1. Kontrollverdau von pASK-IBA3c-ko <i>Spy49_1658c</i>	70
3.6.2. Bestätigung der Deletion von <i>Spy49_1658c</i> auf DNA-Ebene	71
3.6.3. Bestätigung des Verlustes von <i>Spy49_1658c</i> in Δ <i>Spy49_1658c</i> auf RNA-Ebene.	73
3.6.4. Erhöhte Toleranz von Δ <i>Spy49_1658c</i> auf Stressplatten mit MS	74
3.7. Physiologische Charakterisierung von <i>Spy49_1658c</i>	76
3.7.1. Wachstumskinetik und Azidifizierungsrate von Δ <i>Spy49_1658c</i> blieben unverändert in THY, CDM und DMEM+GlutaMAX™ im Vergleich zum WT M49 591	76
3.7.2. Verbrauchsdaten essentieller und nicht-essentieller Aminosäuren für M49 591 und <i>Spy49_1658c::TnSpc</i> 32H3, 68C8 und 90C11	79
3.8. Phänotypanalyse exponentiell wachsender Kulturen von Δ <i>Spy49_1658c</i>	83
3.8.1. MS-Toleranz von Δ <i>Spy49_1658c</i> erhöht im Vergleich zum WT	83
3.8.2. Konz. an MS für eine signifikante Wachstumshemmung von mind. 50 % bei Δ <i>Spy49_1658c</i> verringert im Vergleich zu M49 591	85
3.9. Signifikant verringerte Oberflächenhydrophobizität von Δ <i>Spy49_1658c</i>	91
3.10. Virulenzverhalten von Δ <i>Spy49_1658c</i>	92
3.10.1. Verändertes Adhärenzvermögen von Δ <i>Spy49_1658c</i> an humane Keratinozyten HaCaT	93
3.10.2. Überlebenseffizienz von Δ <i>Spy49_1658c</i> in humanen Vollblut stark vermindert	95
3.10.3. <i>Spy49_1658c</i> zeigte keinen Einfluss auf die Phagozytoserate von J774A.1 Monozyten-Makrophagen	95
4. Diskussion.....	98
4.1. Charakterisierung des Transposonsystems <i>TnSpc</i>	98
4.2. Selektion von <i>TnSpc</i> -Mutanten unter oxidativem Stress	98
4.2.1. Serotyp-abhängige Unterschiede in Anzahl MS- und H ₂ O ₂ -sensitiver <i>TnSpc</i> Mutanten.....	99
4.3. Lokalisation von <i>TnSpc</i> in M18- und M49-Mutanten mit veränderter Empfänglichkeit gegenüber MS u./o. H ₂ O ₂ u. Col.	100
4.4. Charakterisierung von <i>Spy49_1658c</i>	104
4.4.1. <i>In-silico</i> Untersuchungen zur Funktionsaufklärung der Genregion <i>Spy49_1658c</i> bis <i>Spy49_1659c</i>	105
4.4.2. Physiologische Charakterisierung von <i>Spy49_1658c</i>	106
4.4.3. Veränderte Oberflächenhydrophobizität durch den Funktionsverlust von <i>Spy49_1658c</i>	108

4.4.4. Einfluss von <i>Spy49_1658c</i> auf die Virulenz von <i>S. pyogenes</i> M49 <i>in vitro</i>	109
5. Literatur	112
6. Anhang	126
6.1. Geräte, Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	126
6.1.1. Geräte und Software	126
6.1.2. Chemikalien und Reagenzien	127
6.1.3. Verbrauchsmaterialien und Kits	130
6.1.4. Plasmide und Enzyme	131
6.1.5. antimikrobielle Peptide	132
6.2. Zusammensetzung CDM	132
6.3. Einzelergebnisse	135
6.3.1. Southern-Blot Analysen	135
6.3.2. Northern-Blot Ergebnisse	143
6.3.3. Wachstumskinetik <i>Spy49_1658c::TnSpc</i> Stämme 32H3, 68C8 und 90C11	145
6.3.4. Wachstumsparameter für M49 591 und <i>Spy49_1658c::TnSpc</i> 32H3, 68C8 und 90C11 zur Bestimmung Verbrauchsrate essentieller AS	149
6.3.5. Veränderte Oberflächenhydrophobizität der <i>Spy49_1658c::TnSpc</i> Stämme 68C8 und 90C11	150
6.3.6. Multiplikationsfaktor des WT M49 591 und Δ <i>Spy49_1658c</i> in DMEM+GlutaMAX™ während Adhäsions/Internalisierungsassay mit HaCaT-Zellen	151
6.3.7. Vermehrungspotential von Δ <i>Spy49_1658c</i> in DMEM+GlutaMAX™+Pyruvat während des Phagozytoseassay mit J774A.1 entsprach M49 591	152
6.4. Abbildungsverzeichnis	153
6.5. Tabellenverzeichnis	155
6.6. Publikationsliste	156
6.6.1. Veröffentlichung in Fachzeitschriften	156
6.6.2. Tagungsbeiträge (Poster und Vorträge)	156
6.7. Selbstständigkeitserklärung	157

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
A.	Aqua
Abb.	Abbildung
ABTS	Diammonium-2,2'-azino-di-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)
AMPs	antimikrobielle Peptide
Amp ^r	Ampizillinresistenz
ATCC	American type culture collection
bidest.	zweifach destilliert
bp	Basenpaar(e)
C	Cytosin
°C	Grad Celcius
CDC	Centers for Disease Control and Prevention; Gesundh.behörde USA
CDM	Chemical Defined Medium
Col.	Colistinsulfatsalz
CSPD	Disodium 3-(4-methoxyspiro {1,2-dioxetane-3,2'-(5'-chloro)tricyclo [3.3.1.1 ^{3,7}]decan}-4-yl)phenyl phosphate
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIG 11 dUTP	Digoxigeninmarkiertes Desoxyuridintriphosphat
DMEM	Dulbecco's modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	desoxyribonucleic acid; Desoxyribonukleinsäure
dNTP(s)	Desoxyribonukleosidtriphosphat€
dUTP(s)	Desoxyuridintriphosphat(e)
Δ	delta
EDTA	Ethylendiamintetraazetat; Ethyldiamintetraessigsäure
<i>et al.</i>	et alii; und Andere
EtOH	Ethanol
F	forward; vorwärts
G	Guanin
GAS	Gruppe A Streptokokken
gDNA	genomische DNA
HaCaT	Human adult low Calcium high Temperature Keratinocytes

hiFKS	hitzeinaktiviertes fötales Kälberserum
HRP	Horseradish (Meerrettich) Peroxidase
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
Km ^r	Kanamycinresistenz
LDF	linear discriminant function
LTA	Lipoteichoicacid
MCS	Multiple Cloning Site
MgCl ₂ (x 6H ₂ O)	Magnesiumchlorid (Hexahydrat)
min	Minuten
mM	Millimolar; Millimol (10 ⁻³ Mol) je Liter
MOI	Multiplizität der Infektion (Multiplicity of infection)
ms	Millisekunde (10 ⁻³ Sekunden)
MS	Menadionsnatriumsalz
mU	Milliunits (10 ⁻³ Units)
NETs	neutrophil extracellular traps
nM	Nanomolar; Nanomol (10 ⁻⁹) Mol je Liter
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
nt	Nukleotid(e)
Ω	Ohm; elektrischer Widerstand
OD	optische Dichte
pM	Picomolar; Picomol (10 ⁻¹²) Mol je Liter
PMNs	polymorphonuclear neutrophils
®	registered trade mark
ROS	reactive oxygen species
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat (Sodium dodecyl sulfate)
s	Sekunden
SF	SiteFinding
Sp ^r	Spektinomycinresistenz
SSDB	Sequence Similarity DataBase
T	Thymin
THF	Tetrahydrofolat
THY	Todd Hewitt Broth and Yeast

TM	trade mark
TRIS	Trishydroxymethylaminomethan
Tr. m.	Trockenmasse
U	Units
Upm	Umdrehungen pro Minute
UTR	untranslated region; nicht-codierender Bereich
UV	Ultraviolett
üN	über Nacht
V	Volt
VE	Volumeneinheit(en)
v/v	volume per volume
w/v	weight per volume
z. B.	zum Beispiel
μF	Mikrofarad (10^{-6} Farad); elektrische Kapazität
μg	Mikrogramm (10^{-6} Gramm)
μl	Mikroliter (10^{-6} Liter)
μM	Mikromolar; Mikromol (10^{-6} Mol) je Liter

1. Einleitung

1.1. *Streptococcus pyogenes* und seine Diversität

Als ausschliesslich humanpathogener Organismus ist *S. pyogenes* für eine Reihe von Krankheiten mit sehr unterschiedlichen Ausprägungen verantwortlich. Die Krankheitsbilder reichen von oberflächlichen Hauterkrankungen wie Impetigo oder Erkrankungen der oberen Atemwege wie Pharyngitis bis hin zu lebensbedrohlich invasiv-toxischen Infekten wie dem toxischen Schocksyndrom und der nekrotisierenden Fasciitis (Carapetis *et al.* 2005; Cunningham 2000). Aufgrund der Antigen-Eigenschaften des zellwand-assoziierten C-Polysaccharids zählt *S. pyogenes* auch zu den Gruppe A Streptokokken (GAS). Die Variabilität der Krankheitsbilder ist auch ein Ausdruck der genomischen Diversität von GAS. Phagen und phagen-assoziierte Gensequenzen leisten einen wesentlichen Beitrag für die genomische Vielfältigkeit. Genetische Informationen für Toxine oder virulenz-assoziierte Proteine wurden häufig mittels Transduktion (phagen-vermittelt) in das Genom von *S. pyogenes* aufgenommen (Wagner und Waldor 2002). So basieren unter anderem Gene für die pyrogenen Exotoxine Spe A, C, H, I, K, L und M sowie für Hyaluronidase und Streptodornase auf Phagengenomen (Brisno *et al.* 2003). Ein Beispiel für die Vielfältigkeit phagenunabhängiger virulenz-assoziiierter Genprodukte stellen Mitglieder der M-Proteinfamilie dar. Diese besitzen am N-terminalen Ende hypervariable Regionen, welche unter anderem durch die Interaktion mit Kontrollproteinen des Komplementsystems (z. B. Faktor H-ähnliche Protein FHL-1) (Johnsson *et al.* 1998), Fibrinogen, Plasminogen und Albumin *S. pyogenes* helfen, die Opsonierung und somit auch die Aufnahme und Abtötung durch Phagozyten zu umgehen (Berggard *et al.* 2001, Whitnack *et al.* 1985, Podbielski *et al.* 1996a, Ji *et al.* 1998). Die hoch variablen N-terminalen Bereiche des M-Proteins sind auch verantwortlich für Abweichungen in den antigenen Eigenschaften von *S. pyogenes*. Diese wurden von 1928 bis 2002 zur serologischen Klassifizierung von mehr als 90 verschiedenen *S. pyogenes* Serotypen (Moody 1967, Facklam und Edwards 1979, Facklam *et al.* 1999), M-Typisierung nach Rebecca Lancefield (Lancefield 1928), genutzt. Erweitert wurde die serologischen Einteilung von GAS durch Sequenzierung des 5'-Bereichs des *emm* Gens, auch *emm*-Typisierung genannt, welches für das M-Protein kodiert. Dadurch konnte das Repertoire an M-Serotypen auf mehr als 120 ergänzt werden (Facklam *et al.* 2002). Epidemiologische Studien zeigten, dass bestimmte M-Serotypen mit bestimmten Krankheitsbildern korrelierten. So konnten gehäuft schwerwiegende invasive Erkrankungen mit M1-Infekten in Verbindung

gebracht werden (O'Brien *et al.* 2002). Serotyp M18 dagegen ließ sich oftmals aus Patienten mit akutem rheumatischem Fieber, einer Folgeerkrankung nach einer *S. pyogenes*-Infektion, isolieren (Brisno *et al.* 2003). Um ein möglichst umfassendes Bild über die molekularen Grundlagen der Abwehrmechanismen von *S. pyogenes* gegenüber oxidativem Stress zu erlangen, erfolgte der Aufbau von Mutantenbanken in zwei Serotypstämmen mit unterschiedlicher Pathogenese. So wurde der verwendete M18 Stamm MGAS 8232 aus einem Patienten mit akutem rheumatischem Fieber isoliert, wohingegen Serotyp M49 Stamm 591 dagegen aus einer Hautinfektion stammt.

1.2. Besiedlungs- und Ausbreitungsbarrieren für *S. pyogenes*

Die menschliche Haut dient als Abgrenzung und als Schutz vor potentiell pathogenen Erregern, wie Viren, Bakterien und Pilzen. So müssen von *S. pyogenes* sowohl mechanische als auch elektrostatische Abstoßungsmechanismen für eine erfolgreiche Adhärenz an Epithelzellen der Haut überwunden werden (Cunningham 2000). Darüber hinaus stellt die residente Hautflora eine weitere Barriere für die Besiedlung durch *S. pyogenes* dar, da sie mit *S. pyogenes* sowohl um Bindungsstellen zur Adhärenz als auch um Nährstoffe konkurrieren. Die Haut ist ein mehrschichtiges Organ, wobei die äußerste Hülle als Epidermis bezeichnet wird. Mit bis zu 90 % stellen Keratinozyten den weitaus größten Anteil an epidermalen Zelltypen. Keratinozyten sind auf verschiedenen Ebenen an der Abwehr bakterieller Erreger, wie *S. pyogenes*, beteiligt. So können bakterielle Antigene Keratinozyten zur Synthese von ROS, insbesondere Superoxidanionen ($O_2^{\cdot-}$) stimulieren (Grange *et al.* 2009). Darüber hinaus leisten Keratinozyten durch die Bildung und Freisetzung verschiedener AMPs einen wichtigen Beitrag bei der Abwehr verschiedener mikrobieller Organismen (Lai und Gallo 2009). So sind humane beta-Defensine (hBDs) und Cathelicidine, beides Gruppen von AMPs, zur Wachstumsinhibition und Abtötung einer Reihe bakterieller Spezies und Viren fähig (Lai und Gallo 2009; Yamasaki und Gallo 2008; Braff und Gallo 2006). Durch die Sekretion von Chemokinen und Zytokinen aktivieren Keratinozyten die Einwanderung von neutrophilen Killerzellen und T-Lymphozyten zum Infektionsherd (Pivarcsi *et al.* 2004). Keratinozyten bilden somit neben einer physikalischen Barriere auch eine immunologisch aktive Barriere. Einen weiteren wichtigen Bestandteil der menschlichen Immunantwort stellen neutrophile Zellen, wie polymorphkernige Leukozyten (PMNs), dar. Diese zirkulieren im Blut und werden bei einer Infektion in das betroffene Gewebe rekrutiert. Dort angelangt, tragen sie durch Phagozytose, durch Sekretion von ROS u./o. AMPs in die Umgebung, sowie durch

Bildung von spinnenetzartigen chromatinhaltigen Proteinstrukturen, sogenannten „nuclear extracellular traps“ (NETs) zur Inaktivierung und Abtötung von *S. pyogenes* bei. NET-Strukturen entstehen durch Freisetzung des Zellkerninhaltes und beinhalten neben DNA auch Proteasen, AMPs und ROS (Brinkmann *et al.* 2004; Segal 2005). Für Makrophagen, einer weiteren Gruppe von phagozytären Zellen des Immunsystems, spielen ROS bei der Beseitigung aufgenommener Mikroorganismen ebenfalls eine wichtige Rolle. Desweiteren bewirken Makrophagen durch die Sekretion entzündungsfördernder Chemokine und Zytokine die Einwanderung und Differenzierung neutrophiler Zellen zum Infektionsort (Abtin *et al.* 2014; Chen und Nunez 2010). Unterstützt werden Phagozyten vom Komplementsystem. Hierbei handelt es sich um Proteine des Blutplasmas, welche nach Aktivierung auf der Oberfläche von *S. pyogenes* binden und über Rezeptoren für Komplementproteine von Phagozyten erkannt und aufgenommen werden. Die Komplementaktivierung führt jedoch auch zur Synthese von Chemoattraktoren, welche Makrophagen und PMNs zum Ort der Komplementaktivierung leiten und auch zur Aktivierung von Phagozyten führen (Janeway *et al.* 2001).

Sowohl durch Keratinozyten als auch durch Phagozyten bereitgestellte ROS und AMPs stellen effektive Waffen zur Inaktivierung und Abtötung einer Vielzahl pathogener Erreger dar. Für eine systemische Ausbreitung muss *S. pyogenes* deshalb Barrieren, wie sie z. B. die menschliche Haut darstellt, überwinden und Abwehrmechanismen des Immunsystems umgehen.

1.2.1. ROS und AMPs zur Abwehr pathogener Organismen

ROS sind unter aeroben Bedingungen natürlich vorkommende Bestandteile des zellulären Metabolismus. Von oxidativem Stress wird gesprochen, wenn die Konzentrationen an ROS die vorhandenen Kapazitäten zur Abwehr- und Reparatur von oxidativen Schäden überschreiten. Vor allem vielfach ungesättigte Verbindungen, wie Membranlipide aber auch DNA, RNA und Proteine stellen Zielstrukturen für den zerstörenden Angriff von ROS dar. Die Folgen sind Lipidperoxidation, Einzel- und Doppelstrangbrüche der DNA, Adduktbildung von DNA-Basen und Zuckerbausteinen, Störung der Replikation infolge von DNA-Strangbrüchen, Quervernetzung von DNA-Strängen (Sies 1993; Sies 1992) und Proteininaktivierung. Hydroxylradikale ($\text{OH}\cdot$) zählen zu den ROS mit dem größten toxischen Potential (Cabiscol *et al.* 2000), da sie unter anderem in der Lage sind mit allen Bestandteilen der DNA zu reagieren (Halliwell und Gutteridge 1999).

In PMNs und Makrophagen ist die Bildung von ROS zur Inaktivierung u./o. Abtötung potentieller Krankheitserreger intensiv untersucht worden. Infolge eines bakteriellen oder pathogenen Stimulus kommt es dort zum „respiratory burst“, d. h. zu einer verstärkten Produktion von $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , OH^{\cdot} und singulett Sauerstoff (1O_2) (DeCoursey und Ligeti 2005). Durch Dismutation von $O_2^{\cdot-}$ entsteht H_2O_2 und die Fenton Reaktion sorgt in Gegenwart von Eisenionen für die Bildung von OH^{\cdot} aus H_2O_2 und $O_2^{\cdot-}$. NAD(P)H-Oxidasen sind durch ihre Fähigkeit zur Übertragung von einem einzelnen Elektron auf O_2 zur Synthese von $O_2^{\cdot-}$ fähig (Babior 1991), wobei in neutrophilen Zellen die mit Hilfe von NAD(P)H-Oxidasen produzierte $O_2^{\cdot-}$ -Menge um ein Vielfaches höher ist als in nicht-phagozytären Zellen (Valko *et al.* 2007). In geringen Konzentrationen spielen ROS in physiologischen Mechanismen zur Abwehr von Krankheitserregern, in einer Reihe von Signalsystemen oder bei der Induktion von mitogenen Effekten, eine nicht unwesentliche Rolle (Valko *et al.* 2007; Valko *et al.* 2006).

Daneben stellen AMPs ein zusätzliches wichtiges antimikrobielles Agens dar, welches aber im Gegensatz zu ROS lediglich von Phagozyten und Keratinozyten gebildet wird. Die Mehrheit der AMPs sind amphipate Moleküle mit einer positiven Gesamtladung. Diese Eigenschaften erlauben einen direkten Kontakt und anschließende Penetration der negativ geladenen bakteriellen Zelloberfläche (Jenssen *et al.* 2006; Yeaman und Yount 2003). Defensine gehören zu einer Gruppe von AMPs, welche durch Interaktion mit Phospholipiden Poren in bakterielle Membranen ausbilden (Wimley *et al.* 1994). Wiederum andere AMP-Vertreter, wie z. B. Mersacidin, beeinträchtigen die Peptidoglykanbiosynthese (Brotz *et al.* 1998). Auch Wechselwirkungen mit intrazellulären Zielstrukturen, welche zur Störung der Biosynthese von Zellwandbestandteilen, Nukleinsäuren oder Proteinen führen, sind bekannt (Brogden 2005; Zasloff 2002). Weitere wichtige Eigenschaften von AMPs sind die Stimulierung der Chemokin- und Zytokinfreisetzung, die Rekrutierung von PMNs, Makrophagen und Natürlichen Killerzellen (NK) sowie ihre Funktion als Adjuvant bei der Bildung von Antikörpern (Tani *et al.* 2000; Gallo und Huttner 1998). AMPs können somit auch als Kommunikationsmittel zwischen dem angeborenen und erworbenen Immunsystem eingesetzt werden.

In der Haut sind Vertreter von gleich zwei bedeutenden AMP-Familien anzutreffen, die Familie der Cathelicidine und Defensine. Beim Menschen ist bis jetzt nur ein Mitglied der Cathelicidin-Familie gefunden worden, das Peptid LL-37 (Durr *et al.* 2006; Zanetti 2004). Die Synthese von LL-37 erfolgt in Epithelzellen und verschiedenen Immunzellen der Haut, wie neutrophilen Zellen, Mastzellen und Natürlichen Killerzellen. Zusätzlich kann LL-37

auch in die Haut, Lunge, Darm, Brustdrüsen und Nebenhoden sekretiert werden (Bernard und Gallo 2011). Die Proteinfamilie der Defensine wird in zwei Gruppen unterteilt, in die Gruppe der alpha- und der beta-Defensine. Für die Synthese von alpha-Defensinen sind neutrophile Immunzellen und für die Bildung von beta-Defensinen Keratinozyten verantwortlich (Koczulla und Bals 2003). Ein Charakteristikum von Defensinen ist ihr breites Wirkungsspektrum, sie sind sowohl gegen Bakterien, Viren und Pilze antimikrobiell wirksam (Selsted *et al.* 1985; Selsted *et al.* 1984; Daher *et al.* 1986). Sowohl Cathelicidine als auch Defensine besitzen chemotaktische Eigenschaften zur Rekrutierung verschiedener Immunzellen wie Phagozyten und T-Zellen (Gallo *et al.* 2002; Niyonsaba *et al.* 2004; Niyonsaba *et al.* 2002; Yang *et al.* 1999; De *et al.* 2000).

Die Bildung von ROS (Ichikawa *et al.* 2012; Bae *et al.* 2009) wird ebenso wie die Expression von Genen für AMPs (Bernard und Gallo 2011; Lai *et al.* 2010) durch Toll-like-Rezeptoren (TLRs) vermittelt. TLRs gehören zu den „pattern recognition“ Rezeptoren, welche zur Detektion von mikrobiellen Zellwand-Bestandteilen und Nukleinsäuren pathogener Organismen und des Wirtes eingesetzt werden (Janeway und Medzhitov 2002).

1.3. Virulenzfaktoren von *S. pyogenes* zur Besiedlung des Menschen

Um den menschl. Organismus erfolgreich besiedeln und in ihn vordringen zu können, kommt es in *S. pyogenes* zu einer fein abgestimmten Regulation einer Vielzahl von Virulenzfaktoren. So ist *S. pyogenes* mit mehreren Adhäsinen und Invasinen ausgestattet. Die Adhärenzfaktoren können sich von Stamm zu Stamm unterscheiden, je nach genetischer Ausstattung, Gewebepräferenz und den lokalen Umweltbedingungen (Brisno *et al.* 2003). Zu den am ausführlichsten untersuchten und beschriebenen Adhäsinen zählen Lipoteichonsäure (LTA), M-Proteine und Fibronectin-Bindeproteine (FBPs). Über hydrophobe Wechselwirkungen stellt LTA einen losen ersten Kontakt mit der Oberfläche von Wirtszellen her. Im Anschluss sorgen weitere Adhäsine für die benötigte stabile Anhaftung (Hasty *et al.* 1992). M-Proteine werden zur Adhärenz an Keratinozyten benötigt (Okada *et al.* 1994; Okada *et al.* 1995) und spielen auch bei der Anhaftung von *S. pyogenes* an HEp2-Zellen eine Rolle (Wang und Stinson 1994; Courtney *et al.* 1997). Für eine Anlagerung an Hautzellen im Allgemeinen sorgen FBPs, vor allem im Rachenbereich. So begünstigt Sfb I die Adhärenz an Epithelzellen des Respirationstraktes (Hanski *et al.* 1992). Durch das Eindringen in das Innere der Wirtszellen ist *S. pyogenes* vor einem antibakteriellen Angriff durch Phagozyten, Antibiotika und humorale Antikörper geschützt. Darüber hinaus kann *S. pyogenes* auf diese Weise in

tieferes Gewebe vordringen, wo oft günstigere Bedingungen für seine Vermehrung vorherrschen. Virulenzfaktoren wie M-Proteine und das Fibronektin-Bindeprotein F1 (Prt F1) interagieren mit GAS-Adhäsinen und Wirts-Integrinen sowie ihren Liganden und helfen auf diese Weise bei der Internalisierung von Wirtszellen. Auch eine Beteiligung dieser Proteine bei der Umstrukturierung des Zytoskeletts von Wirtszellen ist beschrieben worden (Cue *et al.* 1998; Ozeri *et al.* 1998). Bei einer invasiven Ausbreitung sorgen die Zytolysine Streptolysin O (SLO) und S (SLS) durch die Bildung von Poren in den Zellmembranen neutrophiler Zellen für deren Zerstörung (Timmer *et al.* 2009; Miyoshi-Akiyama *et al.* 2005; Brisno *et al.* 2003). Streptolysin O ist weiterhin an der Beseitigung von Thrombozyten beteiligt (Brisno *et al.* 2003). Streptokinase stellt einen weiteren wichtigen Virulenzfaktor für die invasive Ausbreitung von *S. pyogenes* dar, da es in Verbindung mit Plasminogen die Umwandlung von Plasminogen zu Plasmin katalysiert und auf diese Weise zur Auflösung von Blutgerinnseln beiträgt. Ferner begünstigen Virulenzfaktoren wie C5a Peptidase, Streptokokken pyrogenes Exotoxin B (SpeB) und Komplementinhibitor SIC von Serotyp M1 eine invasive Ausbreitung von *S. pyogenes*. Allgemein führt die Fähigkeit zur Umgehung oder Inaktivierung des Komplementsystems zur Erhöhung der Virulenz, da das Komplementsystem zur Opsonierung pathogener Organismen beiträgt und entzündungsfördernde Immunreaktionen einleitet (Janeway *et al.* 2001). Aber auch Virulenzfaktoren wie die Hyaluronsäure-Kapsel und das M-Protein, welche zur Unterbindung der Phagozytose dienen, spielen eine wichtige Rolle für das Überleben im menschlichen Wirt. DNasen sichern den Fortbestand von *S. pyogenes* im Menschen indem sie NETs-Strukturen des angeborenen Immunsystems zerstören (Brinkmann *et al.* 2004; Ferreira *et al.* 1992; Sumby *et al.* 2005).

Zwei-Komponentensysteme (TCS) und „stand-alone“ Regulatoren sorgen für eine geregelte Expression einer Vielzahl von Virulenzfaktoren (Fiedler *et al.* 2010; Kreikemeyer *et al.* 2003). Dabei werden sowohl die Virulenzfaktoren selbst als auch ihre Regulatoren oft zusammen in bestimmten chromosomalen Regionen kodiert (Fiedler *et al.* 2010), wie z. B. die Genregionen Mga und FCT. Die Mga-Region trägt Gensequenzen für eine Reihe von Virulenzfaktoren, wie das M-Protein oder C5a Peptidase, und für seinen eigenen Regulator (Hondorp und McIver 2007). FCT enthält Gensequenzen für die Regulatoren RofA oder Nra sowie für ein oder mehrere Oberflächenproteine mit Bindedomänen für extrazelluläre Matrixproteine, Peptidasen und Sortasen (Kreikemeyer *et al.* 2004). Im Detail unterscheidet sich der Aufbau beider Genregionen von Serotyp zu Serotyp. Beide arbeiten in einem komplexen regulatorischen Netzwerk zusammen, welches, abhängig von der jeweiligen

Wachstumsphase, für eine koordinierte Kolonisierung, Internalisierung und Persistenz von *S. pyogenes* sorgt (Kreikemeyer *et al.* 2003; Kreikemeyer *et al.* 2004).

1.3.1. Kompensationsmechanismen gegenüber oxidativem Stress

Wie alle Vertreter der Milchsäurebakterien ist auch *S. pyogenes* nicht zur Synthese von Häm-Verbindungen fähig, zu denen auch fast alle Katalasen gehören. Bei der Kompensation von oxidativem Stress nehmen Katalasen eine zentrale Rolle ein, da sie die Detoxifizierung von H_2O_2 durch Reduktion zu Wasser und Sauerstoff katalysieren. Zwischen oxidativem Stress und der Homöostasis von Metallionen gibt es einen direkten Zusammenhang. So können Störungen in der Regulation der intrazellulären Konzentration von Metallionen, zur Induktion von oxidativem Stress führen (Touati *et al.* 1995). Desweiteren setzt das menschl. Immunsystem zur Bekämpfung von potentiellen Krankheitserregern oxidativen Stress in Kombination mit der Erzeugung von Metallmangelbedingungen ein (Brenot *et al.* 2007).

S. pyogenes löst eine Reihe von Erkrankungen mit verstärkten Entzündungsreaktionen, wie Impetigo, Pharyngitis, Myositis oder nekrotisierende Fasciitis, aus. Um am Entzündungsherd überleben zu können, muss GAS effektive Mechanismen zur Kompensation oder Abwehr von oxidativem Stress und zur Aufrechterhaltung der Metallhomöostasis entwickelt haben. Zumal der Organismus unter aeroben Bedingungen auch in der Lage ist, endogen H_2O_2 zu produzieren (Gibson *et al.* 2000). Der wohl bekannteste Peroxidstress Resonanz Regulator PerR nimmt bei der Abwehr von oxidativem Stress in *S. pyogenes* eine wichtige Rolle ein (King *et al.* 2000; Ricci *et al.* 2002). PerR fungiert größtenteils als Repressor und ist ein Mitglied der Fur Familie, einer Proteinfamilie von metallhaltigen Regulatorproteinen (Mongkolsuk und Helmann 2002; Moore und Helmann 2005). Die Bindung von PerR erfolgt an hochkonservierte Operatorsequenzen, auch Per Box genannt, zwischen der -35 und -10 Region der Zielpromotoren (Herbig und Helmann 2001). Reguliert wird die PerR-Bindung durch die Verfügbarkeit von bestimmten Metallionen, FeII und MnII, sowie durch oxidative Bedingungen (Brenot *et al.* 2007). Zu den von PerR direkt beeinflussten Genen, zählt unter anderem das Gen für Csp, einem Kälteschockprotein, und MrgA, ein Mitglied der Dps-eisenbindenden-Proteinfamilie (Brenot *et al.* 2005). Tsou *et al.* (2010) konnten zeigen, dass die Genexpression eines weiteren Mitglieds der Dps-Proteinfamilie, Dpr (Tsou *et al.* 2008; Smith 2004), direkt durch PerR reguliert wird. Dpr-homologe Proteine sind in der Lage, intrazellulär Polymerstrukturen durch Akkumulation auszubilden (Smith 2004). Dadurch kommt es zur Einlagerung proteingebundener Eisenionen, was wiederum durch Unterbindung der Fenton-Reaktion die Toxizität von H_2O_2 minimiert. PerR befindet sich innerhalb einer Operonstruktur, welche auch die Gensequenz für eine putative DNA-Polymerase I, *polA*,

beinhaltet (Toukoki und Gryllos 2013). Eine Deletion von *polA* führte in *S. pyogenes* zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber H₂O₂ und einer verminderten Fähigkeit zur Reparatur von DNA-Schäden nach UV-Einwirkung (Toukoki und Gryllos 2013).

Letztendlich ist die Fähigkeit zur *de novo* Biosynthese beschädigter bzw. oxidierten Bestandteile und die Reparatur dieser ein wichtiger Mechanismus zur Abwehr oxidativer Aggressoren wie ROS. Oxidierte DNA-Bestandteile werden durch das Herausschneiden der betroffenen Basen oder des kompletten Nukleotids mit Hilfe von Phosphatasen, Glykosylasen u./o. des Excinukleasesystems entfernt (Maki und Sekiguchi 1992; Michaels *et al.* 1992; Lin und Sancar 1989; Snowden *et al.* 1990). Anschließend wird die auf diese Weise erzeugte Lücke durch rekombinatorische Mechanismen, ähnlich der DNA-Replikation, geschlossen. Sowohl in gram-negativen als auch in gram-positiven Bakterien besteht eine Zusammenarbeit des Excinukleasesystems und RecA, welches für rekombinatorische DNA-Reparaturmechanismen während der SOS-Antwort zur Beseitigung von DNA-Schäden eingesetzt wird (Au *et al.* 2005; Little und Mount 1982).

Sowohl O₂⁻ und H₂O₂ oxidieren bevorzugt Eisenionen in Eisen-Schwefel-Zentren (Fe-S-Cluster) von Proteinen, was zu einer Inaktivierung der betroffenen Proteine führt. Zur Neubildung von Fe-S-Cluster stehen Bakterien drei Biosynthesewege zur Verfügung, das Nif, Isc und Suf System. Zur *de novo* Synthese und Reparatur von oxidierten Fe-S Strukturen wird hauptsächlich das Suf System herangezogen (Tokumoto *et al.* 2004; Outten *et al.* 2004).

1.4. Transposonsystem TnSpc

Die vorwärts gerichtete Mutagenese stellt ein wichtiges Hilfsmittel zur Identifizierung von bisher unbekannten virulenzassoziierten Genregionen pathogener Mikroorganismen dar. Dabei wird ein selektierbares Markergen zufällig in das Genom inseriert. Im Anschluss werden die erzeugten Transformanten auf einen veränderten Phänotyp untersucht und die Insertion des Markergens im Genom lokalisiert. Die Transposonmutagenese stellt hierin eine konventionelle Methode zur Erzeugung einer Vielzahl von zufälligen Mutanten dar. In dieser Arbeit wurde zur Generierung von umfassenden Mutantenbanken in *S. pyogenes* das Transposonsystem TnSpc herangezogen.

TnSpc ist ein Transposonderivat von Tn4001, welches ein zusammengesetztes Transposon der Klasse I darstellt. Klasse I Transposonelemente werden über einen „cut and paste“ Mechanismus in das Genom inseriert. Tn4001 besteht aus zwei gegenläufigen Wiederholungssequenzen, IS256, welche eine Aminoglykosidresistenzkassette, mit den

Genen *aacA-aphD* zur Selektion einer Unempfindlichkeit gegenüber Gentamycin, Tobramycin und Kanamycin, flankieren (Lyon *et al.* 1987; Byrne *et al.* 1989). Zur genetischen Manipulation einer Reihe von gram-positiven Organismen, z. B. *Streptococcus gordonii*, wurde Tn4001 häufig eingesetzt (Hahn *et al.* 1999). Dennoch besitzt es eine Reihe von Nachteilen, welche eine Optimierung von Tn4001 erforderlich machten. So ist Insertionssequenz IS256 in der Lage sich unabhängig von Tn4001 in das Genom zu integrieren. Darüber hinaus wurde auch häufig der Einbau der gesamten Vektor-DNA beobachtet (Lunsford 1995).

Im Gegensatz zu Tn4001 enthält Tn*Spc* nur eine einzelne Kopie von IS256. Insertionssequenz IS256 ist durch folgende Charakteristika gekennzeichnet: 1) Ein offener Leserahmen, kodierend für eine Transposase, wird von einer gegenläufigen Wiederholungssequenz aus insgesamt 26 Basenpaaren am 3'- und 5'-Ende umrahmt. 2) Zur Selektion erfolgte der Einbau einer Gensequenz für die Resistenz gegenüber Spektinomycin in IS256 (Lyon *et al.* 1998). 3) Das komplette Plasmidkonstrukt, einschließlich des Tn4001 Derivats Tn*Spc*, wurde als pMGC57-*spc* (Plasmidkarte siehe Abb. 1) bezeichnet und ist ausschließlich zur Replikation in gram-negativen Organismen fähig (Lyon *et al.* 1998). Auf diese Weise sollte abgesichert werden, dass Spektinomycin-resistente *S. pyogenes* Transformanten ausschließlich durch Insertion von Tn*Spc* in das Wirtsgenom hervorgehen. Darüber hinaus konnte Lyon *et al.* (1998) belegen, dass Tn*Spc* mit einer hohen Frequenz von 10^3 bis 10^5 Transformanten pro μg Plasmid-DNA zufällig in das Genom von *S. pyogenes* inseriert.

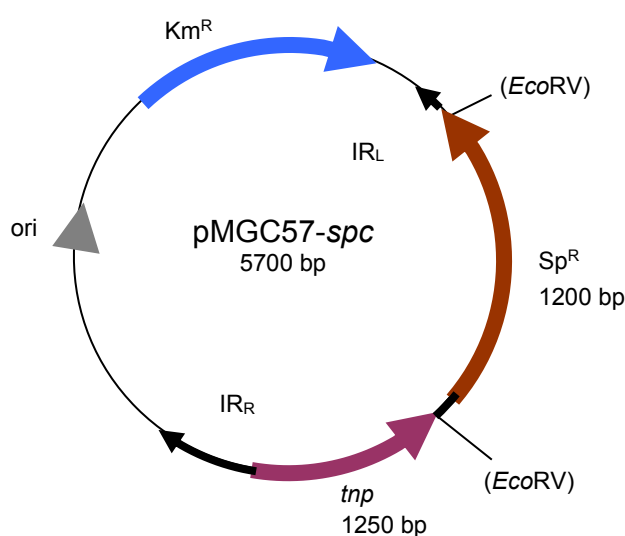


Abb. 1: Schematische Darstellung des Vektors pMGC57-*spc* nach Lyon *et al.* 1998.

Wichtige Charakteristika wurden entsprechend farbig gekennzeichnet. Transposonelement Tn*Spc* setzte sich aus den terminalen „inverted repeats“ IRL/IRR, einer Gensequenz für die Transposase *tnp* und der Resistenzkassette für Spektinomycin *Sp^R* zusammen. Eine weitere

Kanamycinresistenz Km^R sowie ein Origin zur Replikation in *E. coli* (ori) sind ebenfalls enthalten.

1.5. Ziel dieser Studie

Als humanpathogener Organismus ist *S. pyogenes* für die Ausbildung eines breit gefächerten Spektrums an Krankheitsbildern verantwortlich, von oberflächlichen Hautinfektionen bis zu schwerwiegenden systemischen Erkrankungen. Maßgeblich dafür ist ein hoher Grad an genomischer Diversität, welcher größtenteils durch Phagen- und phagen-assoziierte Gensequenzen mit Informationen für verschiedenste Virulenzfaktoren hervorgerufen wird. Jedoch tragen auch variable phagen-unabhängige DNA-Abschnitte zur Virulenz von *S. pyogenes* bei, wie z. B. das Gen für das M-Protein. Sowohl bei der oberflächlichen Besiedlung als auch während der systemischen Ausbreitung schafft es *S. pyogenes* effektiv ROS und AMPs, welche vom menschlichen Immunsystem zur Inaktivierung und Abwehr pathogener Organismen eingesetzt werden, zu überwinden. Die Identifizierung des Peroxidstress-Regulators, PerR, war ein wichtiger Schritt zur Aufklärung der von *S. pyogenes* genutzten Kompensationsmechanismen unter oxidativen Bedingungen. Jedoch ist noch nicht vollständig geklärt, wie dieser Organismus es schafft in Gegenwart von ROS und AMPs zu überleben.

Ziel dieser Studie war deshalb die Identifizierung unbekannter virulenz-assoziiierter Faktoren zur Kompensation von oxidativem und AMP-Stress in *S. pyogenes*. Hierfür wurden umfangreiche Mutantenbanken in zwei unterschiedlichen Serotypen, M18 und M49, generiert. Der verwendete Stamm M18 MGAS8232 stammt aus einem Patienten mit akutem rheumatischem Fieber und Stamm M49 591 ist ein Hautisolat. Beide Serotypen stehen repräsentativ für die hoch-variable Ausprägung einer Infektion mit *S. pyogenes*. Gleichzeitig sollte damit ein möglichst umfassendes Bild über die molekularen Abwehrmechanismen von *S. pyogenes* gezeichnet werden. Darüber hinaus können diese Informationen auch bei der Entwicklung neuer Therapieansätze behilflich sein.

2. Material und Methoden

2.1. Prokaryotische Stämme und Plasmide

2.1.1. Prokaryotische Stämme

Zwei unterschiedliche Serotypen von *S. pyogenes* wurden zur Generierung der transposon-basierten Mutantenbanken herangezogen, Serotyp M18 Stamm MGAS8232 (Smoot *et al.* 2002) und Serotyp M49 Stamm 591 (Stammsammlung R. Lütticken; Aachen). Eine *Spy49_1658c* Deletionsmutante wurde während dieser Arbeit im Serotyp M49 Stamm 591 generiert.

Zur Vervielfältigung der verwendeten Plasmidkonstrukte wurde der *E.coli* Stamm DH5'α (Gibco-BRL) verwendet.

2.1.2. Plasmidkonstrukte

In Tabelle 1 befindet sich eine Liste aller verwendeter Plasmidkonstrukte.

Tab. 1: Übersicht der Plasmide, ihre Herkunft und Charakteristika.

Plasmid	Herkunft	Charakteristika
pMGC57-spc	Lyon <i>et al.</i> 1998; LeBlanc <i>et al.</i> 1991	Km ^r ;Sp ^r ; mod. IS256 von Tn4001 mit <i>EcoRV</i> Schnittstelle zur Integration von <i>aad9</i> aus pGEM7-spc
pBlueScript II KS(+)	Fermentas; Thermo Fisher Scientific	Amp ^r ; MCS innerhalb <i>lacZ</i>
pASK-IBA3c	IBA GmbH	Cam ^r ; Strep II (C-terminal)
pFW5	Podbielski <i>et al.</i> 1996b	Sp ^r
pASK-IBA3c-ko <i>Spy49_1658c</i>	diese Arbeit	Cam ^r ; Sp ^r ; 890 bp 5' flankierende Region (<i>EcoRI/SalI</i>) und 570 bp 3' flankierende Region (<i>NcoI/HindIII</i>) von <i>Spy49_1658c</i> aus GAS M49 591; <i>aad9</i> Kassette aus pFW5 (<i>SalI/NcoI</i>)

2.2. Eukaryotische Zelllinien

Untersuchungen zum Virulenzverhalten von *S. pyogenes* erfolgten in Gegenwart von eukaryotischen Zellen der Linie J774A.1 (ATCC TIB-67®) und HaCaT (human adult low

calcium high temperature keratinocytes; DKFZ). Bei den Zellen der Linie J774A.1 handelte es sich um eine Monozyten-Makrophagen Mischpopulation, gewonnen aus dem Labormausstamm BALB/cn (Ralph *et al.* 1976). Die humane Keratinozyten Zelllinie HaCaT wurde vom Deutschen Krebsforschungszentrum Heidelberg erworben und wurde ursprünglich von einem Malignom der oberen Rückenhaut (Boukamp *et al.* 1988) isoliert.

2.3. Nährmedien und Puffer

Alle aufgeführten Nährmedien, mit Ausnahme von CDM, wurden zur Sterilisation bei 121°C und 2 bar für 20 min autoklaviert. Antibiotikazugabe erfolgte nach dem Autoklavieren. Zur Herstellung von festen Nährmedien erfolgte die Zugabe von 1,5 % (w/v) technischem Agar vor dem Autoklavieren.

In Tabelle 2 und 3 sind die Zusammensetzungen der Medien und Puffer nachzulesen. Für CDM erfolgte hier lediglich die Angabe der eingesetzten Kohlenstoffquelle, eine detaillierte Auflistung aller Inhaltsstoffe sowie die methodische Vorgehensweise der Zubereitung befindet sich Anhang unter Abschnitt 6.2. und Tab. 13.

Tab. 2: Übersicht der Nährmedien.

Alle Mengenangaben beziehen sich auf ein Gesamtvolumen von einem Liter.

<u>LB (Lysogeny Broth) -Medium</u>	
Luria-Bertani Base	20,00 g
NaCl	4,50 g
<u>THY (Todd-Hewitt-Broth-Yeast) -Medium</u>	
Todd-Hewitt-Broth	36,40 g
Hefeextrakt	5,00 g
<u>CDM (Chemical defined Media)</u>	
Glukose	10,00 g

Tab. 3: Zusammensetzung der Pufferlösungen.

Die angeführten Mengen- und Volumenangaben beziehen sich auf ein Gesamtvolumen von einem Liter.

<u>10x PBS (Phosphatgepufferte Salzlösung); pH 7,4</u>	
KCl	26,83 mM (2,00 g)
KH ₂ PO ₄	17,64 mM (2,40 g)
NaCl	1,34 M (80,00 g)
Na ₂ HPO ₄	101,44 mM (14,40 g)
<u>20x SSC (Natrium-Citrat-Salzlösung); pH 7</u>	
NaCl	3 M (175,32 g)
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	0,30 M (88,23 g)
<u>50x TAE (TRIS-Azetat-EDTA) Puffer</u>	
TRIS	2 M (242,00 g)
Essigsäure 100 %	57,10 ml
EDTA 0,5 M; pH 8	100,00 ml

2.4. Bakterienanzucht**2.4.1. Vorkultivierung von *S. pyogenes***

Sofern nicht anderweitig angegeben, wurden alle verwendeten GAS Stämme in THY Flüssigmedium bei 37°C in einer 20 % O₂/5 % CO₂-Atmosphäre über Nacht für 16-20 Stunden bebrütet. Als Inokulum dienten konzentrierte und kryokonservierte THY-Kulturen mit 20 % (v/v) Glycerol. Vorkulturen der Tn*Spc*-Insertionsmutanten sowie der generierten *Spy49_1658c* Deletionsmutante wurden mit dem Antibiotikum Spektinomycin (MP Biomedicals), Endkonzentration 60 µg/ml, versehen.

Zur Lagerung bei -20/-80°C wurden von allen Wildtyp- und Mutantenstämmen Glycerolproben angelegt. Stationäre Kulturen wurden bei 3345 x g für fünf Minuten zentrifugiert, das resultierende Zellpellet anschließend in THY mit 20 % Glycerol (v/v) aufgelöst und in 2,0 ml Kryogefäße überführt.

2.4.2. Generierung von Tn*Spc*-Mutantenbanken

Nach Elektroporation kompetenter M18 und M49 GAS-Zellen mit pMGC57-*spc* (siehe Kapitel 2.6.12.) wurden spektinomycinresistente Klone weitere zweimal auf THY-Agarplatten mit 60 µg/ml Spektinomycin überführt. Anschließend erfolgte der Transfer von stabilen Tn*Spc*-Insertionsmutanten auf 96-Well-Platten mit 200 µl antibiotikahaltigem THY-

Flüssigmedium pro Well. Zusätzlich wurde auf jede 96-Well-Platte der WT ohne Zugabe von Antibiotika beimpft. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C und 5 % CO₂ bebrütet, danach mit sterilem Glycerol (Endkonz. 20 %) vervollständigt und versiegelt (Easy Sealer, Greiner Bio-One). Zur Lagerung wurden die Platten bei -80°C aufbewahrt.

2.4.3. Bestimmung von Wachstumskinetiken

Vorkulturen wurden einmalig mit THY ohne Antibiotikumzusatz gewaschen. Anschließend wurde die optische Dichte bei 600 nm (OD_{600nm}) ermittelt und der Verdünnungsfaktor für Kulturen mit einer anfänglichen OD_{600nm} von 0,05 berechnet. Das entsprechende Volumen der gewaschenen Vorkulturen wurde als Inokulum eingesetzt. Im Anschluss wurde der Wachstumsverlauf der Batch-Kultur durch Messung der OD_{600nm} in einem Zeitraum von bis zu 12 Stunden festgehalten.

Die visuelle Auswertung der erhaltenen Wachstumsdaten erfolgte mit Hilfe von Excel (Microsoft®) in einem halblogarithmischen Liniendiagramm. Während des exponentiellen Wachstums, welcher durch einen Bereich mit linearem Anstieg gekennzeichnet ist, konnte durch folgenden mathematischen Zusammenhang die Wachstumsrate μ und die Verdopplungszeit td ermittelt werden.

$$\mu = \frac{\log x_2 - \log x_1}{\log e * (t_2 - t_1)}$$

μ = Wachstumsrate [1/h]
 x_1, x_2 = Messwerte zu den Zeitpunkten t_1, t_2
 e = Eulersche Zahl
 t_1, t_2 = Zeitpunkte der Messung
 \log = Logarithmus zur Basis 10

$$td = \frac{\ln 2}{\mu}$$

td = Verdopplungszeit [h]
 \ln = natürlicher Logarithmus

2.4.4. Kultivierung von *E. coli*

Zur Anzucht plasmidtragender *E. coli* Stämme mit *aad9* als Resistenzmarkergen wurde LB-Medium mit 100 µg/ml Spektinomycin verwendet. DH5'α Stämme, welche Plasmidkonstrukte mit Resistenzgenen für die Antibiotika Ampizillin, Kanamycin bzw. Chloramphenicol beinhalten, wurden in LB Medium mit 100 µg/ml Ampizillin, 20 µg/ml Kanamycin bzw. 20 µg/ml Chloramphenicol angezogen. Alle Kulturen wurden für 16-20 Stunden bei 37°C und 180 Upm in einem Schüttelinkubator (IKA; KS 4000 I Control) bebrütet und anschließend zur Plasmidisolierung oder zum Anlegen von kryokonservierten Glycerolproben genutzt.

Um Plasmidkonstrukte dauerhaft zu lagern, wurden über-Nacht-Kulturen bei 3345 x g für fünf Minuten abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde nach Entfernen des Kulturüberstandes in LB-Medium mit 20 % (v/v) Glycerol aufgelöst und in Kryoröhrchen zur Aufbewahrung bei -20°C bzw. -80°C überführt.

2.5. Anzucht und Passagierung eukaryotischer Zelllinien

2.5.1. Murine Makrophagen-Monozyten-Zelllinie J774A.1

Für die Anzucht der Monozyten-Makrophagen-Linie J774A.1 wurde DMEM mit 25 mM Glukose und 1 mM Natriumpyruvat (Gibco®; DMEM+GlutaMAX™+Pyruvat) sowie 10 % hitzeinaktiviertem fötalem Kälberserum (hiFKS; v/v) verwendet. Bei 37°C und einer Luftatmosphäre mit 5 % CO₂ wurden die Kulturen bis zur Ausbildung eines konfluenten Zellrasens für zwei bis drei Tage bebrütet. Anschließend erfolgte eine Überführung der adhärennten Makrophagen und der sich in Suspension befindlichen Monozyten in neue Kulturgefäße. Hierfür wurden 50 % des Mediumvolumens entfernt, Makrophagen mechanisch von der Gefäßoberfläche entfernt und die daraus resultierende Suspension aus Monozyten und Makrophagen bei 1125 x g zentrifugiert. Das Pellett wurde in frischem Medium aufgenommen und nachfolgend die Zellzahl mit Hilfe von Trypan-Blau (Invitrogen) im Verhältnis 1:1 und einer Zählkammer (Bürker) ermittelt. Für 75 cm² Kulturgefäße wurden 4*10⁶ Zellen in 20 ml DMEM+Pyruvat/10 % hiFKS (v/v) eingesetzt.

Zur Kryokonservierung wurde Zellkulturmedium mit 10 % hiFKS (v/v) und 5 % Dimethylsulfoxid (DMSO; v/v) verwendet. Die Lagerung der Proben erfolgte bei -80°C.

2.5.2. Humane Keratinozyten-Linie HaCaT

Die Keratinozyten-Linie HaCaT wurde in DMEM mit 25 mM Glukose (Gibco®; DMEM+GlutaMAX™) und 10 % hiFKS (v/v) kultiviert. Hierfür wurden 10⁶ Zellen auf 25 ml Zellkulturmedium für ein 75 cm² Kulturgefäß verwendet und bis zur Ausbildung eines konfluenten Monolayers bei 37°C und einer Atmosphäre mit 5 % CO₂ bebrütet. Zur Passagierung wurde das Medium entfernt, der Zellrasen mit 0,25 % Trypsin-EDTA (Gibco®; w/v) gespült und anschließend die Zellen mit Hilfe von 0,25 % Trypsin-EDTA bei 37°C für 10 min abgelöst. Danach erfolgten die Zugabe von frischem Zellkulturmedium sowie die lichtmikroskopische Bestimmung der Zelldichte mit Hilfe einer Bürker-Zählkammer.

Zur Kryokonservierung wurde frisches DMEM-Medium mit 10 % hiFKS (v/v) und 5 % DMSO (v/v) verwendet. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

2.6. Molekularbiologische Methoden

2.6.1. Präparation genomischer DNA (gDNA) aus *S. pyogenes*

Zwei Methoden, die sich in Arbeitsaufwand und DNA-Ausbeuten unterschieden, wurden zur Isolierung von gDNA aus *S. pyogenes* verwendet. Eine nach Martin *et al.* (Martin *et al.* 1990) modifizierte Methode hatte den Vorteil einer großen Ausbeute an gDNA (bis zu 30 µg), war aber von der Handhabung sehr zeitaufwendig. Als eine zeitsparende Alternative wurde das „DNeasy Blood and Tissue Kit“ von Qiagen zur Isolierung von gDNA herangezogen. Hier lagen die Ausbeuten gewonnener DNA lediglich zwischen 3 und 6 µg. Zur längerfristigen Lagerung wurde die gDNA bei -20°C aufbewahrt.

2.6.1.1. Isolierung von gDNA nach Martin *et al.*

Über-Nacht-Kulturen mit einem Volumen von 30 ml wurden bei 3345 x g für fünf Minuten zentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend in 1 ml Natriumazetat (0,2 M; pH 6,2) aufgenommen und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Es folgte ein Zentrifugationsschritt bei 16.006 x g für drei min. Das Pellet wurde im Anschluss in 0,2 M NaAzetat resuspendiert. Der Waschschrift wurde insgesamt zweimal durchgeführt. Danach erfolgte die Aufnahme des Pellets in 500 µl 100 mM TRIS (pH 7,0)/1 mM EDTA/25 % Glukose (w/v) sowie die Zugabe von 250 U Mutanolysin (in 0,1 M KH₂PO₄-Puffer; pH 6,2; Sigma-Aldrich) und 150 µl Lysoszym (2 mg/ml; Roche). Bei 37°C erfolgte für mind. zwei Stunden der enzymatische Verdau der Zellwand. Nachfolgend wurden die Zellen für zwei min bei 16.006 x g abzentrifugiert und das Pellet in 50 µl Lysispuffer [50 mM EDTA; 0,2 % SDS (w/v); pH 8,5] auf dem Vortex resuspendiert. Mit Lysispuffer wurde das Volumen auf 500 µl aufgefüllt. Zum vollständigen Zellaufschluss wurden die Zellsuspensionen für 30 min bei 70°C inkubiert. Zur Entfernung von SDS aus der alkalischen Lyse erfolgte die Zugabe von 50 µl 5 M Kaliumazetat (pH 5,5) sowie Probeninkubation bei -20°C für 16-20 Stunden. Als nächstes folgte die Extraktion der Nukleinsäurelösung mit Phenol-Chloroform. Zu Beginn wurden dafür alle zellulären Bestandteile durch Zentrifugation bei 16.006 x g für fünf min entfernt. Die obere nukleinsäurehaltige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und 500 µl Phenol (Roti®-Phenol; pH 8,0) zugegeben. Nachdem durch mehrfaches invertieren der

Gefäße die Nukleinsäurelösung mit Phenol ausgeschüttelt wurde, erfolgte die Auftrennung des Gemisches in untere organische, Inter- und wässrige obere Phase durch eine 10-minütige Zentrifugation bei RT und 16.006 x g. In der unteren und der Interphase sammelten sich denaturierte Proteine an. Die wässrige Phase mit darin gelösten Nukleinsäuren wurde in ein sauberes Gefäß überführt und mit 500 µl eines Phenol-Chloroform Gemisches (Verhältnis 1:1) durch invertieren erneut ausgeschüttelt. Die Aufreinigung mittels Phenol-Chloroform wurde insgesamt viermal vorgenommen, wobei zur Phasentrennung dazwischen jeweils ein 10-minütiger Zentrifugationsschritt bei RT und 16.006 x g erfolgte. Im Anschluss wurden Phenolreste durch eine Nukleinsäurefällung mit zwei Volumeneinheiten (VE) Ethanol (96 %; v/v) und Zentrifugation bei 16.006 x g für 15 min entfernt. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet mit 1 ml Ethanol (70 %; v/v) gewaschen. Zur Konzentration der genomischen DNA wurden die Proben in einer Vakuum-Tischzentrifuge eingetrocknet und das Pellet in 100 µl sterilem A. bidest aufgenommen. RNA-Verunreinigungen wurden durch Zugabe von 2 µl RNase A (2 mg/ml; Dnase-frei; Roche) und einer anschließenden Inkubation bei 37°C für 16-20 Stunden beseitigt. Falls nicht anderweitig vermerkt wurden alle Zentrifugationsschritte bei 4°C vorgenommen.

2.6.1.2. DNA-Extraktion mittel DNeasy Blood and Tissue Kit von Qiagen

Zellen aus 10 ml über-Nacht-Kulturen wurden durch Zentrifugieren bei 3345 x g geerntet und anschließend in 180 µl Lysispuffer [20 mM TRIS-HCl (pH 8,0); 2 mM EDTA; 1,2 % Triton®X-100; 20 mg/ml Lysozym] aufgelöst. Lysozym wurde kurz vor Gebrauch in entsprechenden Mengen an Lysis-Puffer aufgelöst. Der enzymatische Verdau der Zellwand erfolgte für drei Stunden bei 37°C. Anschließend wurden jeweils 25 µl Proteinase K und 200 µl Puffer AL zugegeben, die Proben auf dem Vortex kurz vermischt und bei 56°C für 30 min inkubiert. Danach wurden jeweils 200 µl Ethanol (96 %; v/v) hinzugefügt, die Reaktionsgefäße vier bis fünfmal invertiert und das Gemisch auf Säulen mit einer Silica-Membran pipettiert. Die Säulen wurden anschließen für zwei min bei 16.006 x g zentrifugiert der Durchfluß verworfen und die Membran mit 500 µl AW1-Puffer gewaschen. Danach folgte ein weiterer Waschschrift mit 500 µl AW2-Puffer. Zur Eluierung der membran-gebundenen Nukleinsäuren wurden die Säulen in saubere 1,5 ml Reaktionsgefäße übertragen und jeweils 30 µl steriles A. bidest (37°C) direkt auf die Säulenmembran pipettiert. Nach einer fünf-minütigen Inkubation bei RT erfolgte durch Zentrifugation bei 9540 x g für zwei min die Nukleinsäure-Rückgewinnung. Um die Ausbeute an gDNA zu erhöhen wurde der Eluationsschritt wiederholt. Zur Beseitigung von RNA-Verunreinigungen wurde jeweils 1 µl

RNase A (2 mg/ml; DNase frei von Roche) je Ansatz zugegeben und die Proben anschließend für drei Stunden bei 37°C inkubiert.

Alle Zentrifugationsschritte erfolgten bei RT.

2.6.2. RNA-Isolierung aus *S. pyogenes*

Zur Extraktion der Gesamtzell-RNA aus *S. pyogenes* wurden zu drei verschiedenen Zeitpunkten (1. frühe exponentielle Phase; 2. Transitionsphase und 3. stationäre Phase) Zellen von Serotyp M49 WT und $\Delta Spy49_1658c$ geerntet. Mittels FastRNA® Pro Blue Kit von MP Biomedicals erfolgte die Isolierung der Gesamt-RNA. Das gewonnene Zellpellet wurde in 1 ml RNApro™ Lösung vollständig aufgenommen und in bereitgestellte 2 ml Gefäße mit Lyse-Matrix B überführt. Im RiboLyser Homogenisierer von Hybaid erfolgte der Zellaufschluss bei einer gesetzten Geschwindigkeit von 6,0 für 40 Sekunden. Danach wurden die Proben für fünf min zentrifugiert und die wässrigen Überstände in saubere RNase-freie Reaktionsgefäße überführt. Proteine wurden durch Zugabe eines Phenol-Chloroform Gemisches im Verhältnis 1:1 (Roti®-Aqua-Phenol; pH 4,5-5) und Invertieren ausgeschüttelt (Abschnitt 2.6.1.). Dieser Schritt wurde insgesamt viermal durchgeführt. Im Anschluss folgten zwei weitere Waschschrte mit jeweils einer VE Chloroform. Auch hier wurden die Reaktionsgefäße zur Durchmischung der Lösungen invertiert und anschließend zur Phasentrennung für 10 min zentrifugiert. Zur Rückgewinnung der isolierten und aufgereinigten Nukleinsäuren wurden jeweils zwei VE an eiskaltem Ethanol (96 %; v/v) zugegeben und die Proben für 30 min bei -20°C aufbewahrt. Es folgte ein 15-minütiger Zentrifugationsschritt und ein weiterer Waschschrte mit 75 % Ethanol (v/v; in DEPC-H₂O). In einer Vakuum-Tischzentrifuge wurden die Proben getrocknet und das Nukleinsäurepellet im Anschluss in 200 µl A. bidest. mit 0,1 % Diethylpyrocarbonat (DEPC; v/v) aufgelöst. Die gewonnene RNA wurde bei -80°C aufbewahrt. Alle Zentrifugationsschritte erfolgten bei 16.006 x g und 4°C.

2.6.3. Plasmid-Isolierung aus *E. coli*

Durch die Verwendung des QIAprep Miniprep Kits (Qiagen), welches das Prinzip der alkalischen Lyse nach Birnboim und Doly (Birnboim and Doly, 1979) zur Isolierung und Reinigung von Plasmid-DNA verwendet, konnten Ausbeuten von bis zu 15 µg erzielt werden. Dabei wurde wie vom Hersteller empfohlen vorgegangen. Als Ausgangsmaterial dienten

über-Nacht-Kulturen, Gesamtvolumen 5 ml. Plasmidlösungen wurden für Klonierungsexperimente und Sequenzierungen genutzt.

2.6.4. Modifikation von DNA mittels Restriktionsendonukleasen

Soweit nicht anders angegeben wurde max. 1 µg an PCR-Produkten oder Plasmid-DNA mit 10 U des jeweiligen Restriktionsenzym in einem Gesamtvolumen von 30 µl für ein bis drei Stunden (o. über Nacht) behandelt. Die Reaktionszeit wurde an die DNA-Menge bzw. Effizienz des verwendeten Restriktionsenzym angepasst. Beim gleichzeitigen Einsatz von zwei Restriktionsenzymen wurden Pufferbedingungen und Inkubationszeiten entsprechend aufeinander abgestimmt. War dies durch Inkompatibilität der Enzymparameter oder zu geringe Effizienzen nicht möglich, erfolgte die Restriktion schrittweise. In diesem Fall wurde die DNA mit Hilfe des QIAquick PCR Aufreinigungskit (Qiagen; s. 2.6.8.3.) vor Behandlung mit dem zweiten Restriktionsenzym gesäubert.

Für Southern-Blot Analysen wurden fünf µg gDNA mit 10 U des Restriktionsenzym *Pst*I in einem Gesamtvolumen von 80 µl über Nacht bei 37°C geschnitten. Zur Reinigung und Aufkonzentrierung wurde die DNA im Anschluss gefällt (s. 2.6.5.) und in 15 µl sterilem A. bidest aufgenommen.

Bis zu ihrer Verwendung wurden geschnittene DNA-Proben bei -20°C aufbewahrt.

2.6.5. Alkoholische Fällung von DNA

Die folgende Methode der alkoholischen Fällung wurde bei geringen DNA-Konzentrationen eingesetzt.

Zu den Proben wurde 1/10 VE steriles 3 M Natriumazetat (pH 5,2) pipettiert und auf dem Vortex kurz vermischt. Danach wurden 0,7 VE an Isopropanol hinzugefügt, die Proben abermals auf dem Vortex kurz durchgemischt und im Anschluss bei 16.006 x g für 15 min bei RT zentrifugiert. Das ausgefallene Nukleinsäurepellet wurde mit ein bis zwei VE an 70 % Ethanol (v/v) gewaschen und die Proben nachher für 10 min bei 16.006 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet in einer Vakuumzentrifuge für 20 min getrocknet. Die Aufnahme erfolgte zum Schluss in sterilem A. bidest.

2.6.6. Quantifizierung von Nukleinsäuren

Zur photometrischen Bestimmung der Konzentrationen chromosomaler DNA und RNA (Sambrook J. *et al.*, 1989) von *S. pyogenes* wurden unverdünnte und verdünnte Proben im Spektrophotometer von Picodrop™ analysiert. Das Absorptionsmaximum von DNA liegt bei 260 nm. Bei dieser Wellenlänge erfolgte auch die Bestimmung der Extinktion der Proben. DNA-Konz. mit einer Konzentration von 50 µg/ml besitzen bei 260 nm eine optische Dichte von eins, wohingegen RNA-Proben mit einer Konz. von 40 µg/ml eine optische Dichte von 1,0 aufweisen. Das Verhältnis der Absorption bei 260 nm zu 280 nm (A_{260}/A_{280}) gibt Auskunft über die Reinheit der Proben, reine DNA zeigt einen A_{260}/A_{280} -Quotienten von 1,8 und reine RNA einen Quotienten von 2,0.

Konzentrationen von PCR-Produkten und Plasmid-DNA wurde durch den optischen Vergleich der Fluoreszenzintensität zwischen einem DNA-Mengen- und Größenmarker (MassRuler™ Express Forward DNA Leiter; Fermentas) und der Probe selbst nach deren elektrophoretischer Auftrennung bestimmt. Alternativ erfolgte die Konzentrationsbestimmung von Plasmidlösungen auch photometrisch im Spektrophotometer von Picodrop™.

2.6.7. Primersequenzen

In Tabelle 4 wurden alle Primer, ihre Sequenzen sowie zusätzliche Informationen wie z. B. Restriktionsschnittstellen (kursiv dargestellt), oder Basenaustausch aufgelistet.

Tab. 4: Übersicht verwendeter Primer, ihrer Sequenzen sowie weitere wichtige Charakteristika.

Bezeichg.	Sequenz (5'→3')	Vermerk
aad9_for	AAAACCAAATAGTGATCTTGAC	Amplifikation Genabschnitt aus <i>aad9</i> -Kassette von pMGC57- <i>Spc</i> (373 bp)
aad9_rev	TGGCTCTTCTCACATCAG	
Tn <i>Spc</i> _TnR	GAACCTATGGTTAACGAGTG	Amplifikation der Transposase aus pMGC57- <i>Spc</i> (709 bp)
Tn <i>Spc</i> _TnL	AAATCCATTCATCATGTAGG	
SF_A	CACGACACGCTACTCAACACACCACCTC GCACAGCGTCCTCAAGCGGCCGCNNNNN NCTAG	Primer für „SiteFinding“ PCR; Erkennungssequenz für NotI Schnittstelle in SF_A, SF_B, aad9_SF und tnprev_SF (kursiv); degenerierte Primer SF_A und SF_B mit „N“=A,C,G,T
SF_B	CACGACACGCTACTCAACACACCACCTC GCACAGCGTCCTCAAGCGGCCGCNNNNN NGATC	
SF_P1	CACGACACGCTACTCAACAC	
SF_P2	ACTCAACACACCACCTCGCACAGC	
aad9for_SF	ATAGCGGCCGCACTTGACTGAGTTTATG GAAG	
tnprev_SF	ATAGCGGCCGCACATTGTACCGTAAAAG GACTG	
aad9_for1	TAGAGAGAATATTGAATGGAC	
tnp_rev1	TAGAAACGTCATCCTTTACAG	Primer für Dye Terminator PCR und „SiteFinding“ PCR; Austausch G nach <u>A</u> für aad9_for1
allM_for	ATAAGGAGCATAAAAATGGCT	Amplifikation von <i>emm18</i> (1,2 kb) bzw. <i>emm49</i> (1,2 kb) zusätzl. 17 bzw. 15 nt aus 3' UTR
allM_rev	AGCTTAGTTTTCTTCTTTGCG	
Emm_1	TATTCGCTTAGAAAATTAA	<i>emm</i> -Typing Primer nach CDC zur Amplifikation von <i>emm18</i> (926 bp) und <i>emm49</i> (938 bp)
Emm_2	GCAAGTTCTTCAGCTTGTTT	
M13_for	TGTAAAACGACGGCCAGT	Primersequenzen aus pBlueScriptII KS (+)
M13_rev	CAGGAAACAGCTATGACC	
Spy49_1658c_Fl1	TTGGGAATTCACCTTCTGACG	Primersequenzen zur Deletion von <i>Spy49_1658c</i> ; durch Nukleinsäurenaustausch Einbau spezifischer Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme (kursiv hervorgehoben); Amplifikation von <i>aad9</i> aus pFW5
<i>EcoRI</i> _for	TAATGTCGACAATTTCTTTTATTGC	
Spy49_1658c_Fl1	TAATGTCGACAATTTCTTTTATTGC	
<i>Sall</i> _ol_rev	ATATTCCATGGACAAAACAATACGC	
Spy49_1658c_Fl2	ATATTCCATGGACAAAACAATACGC	
<i>NcoI</i> _for	CGTTATTACAAGCTTTTTTATTGATG	
Spy49_1658c_Fl2	CGTTATTACAAGCTTTTTTATTGATG	
<i>HindIII</i> _rev	GATTGTCGACCGTGAATACATG	
aad9_pFW5_ <i>Sall</i> _for	GATTGTCGACCGTGAATACATG	
aad9_pFW5_ <i>NcoI</i> _rev	TTACCATGGAGAATGAATATTTCC	

Fortsetzung Tab. 4:

Bezeichg.	Sequenz (5'→3')	Vermerk
Spy49_1658c_for Spy49_1658c_rev	GCGTATTGTTTTGTAGTAGC GCACTGCAGGAAATTAGAAAG	Amplifikation von <i>Spy49_1658c</i> (284 bp) sowie eines <i>Spy49_1658c/1659c</i> (368 bp) übergreifenden Fragmentes
Spy49_1659c_rev_ complement	GCTAGGTATCCTAATGGACC	
Spy49_1659c_for Spy49_1659c_rev	GCTACTGAGATGATAGGAGG GGTCCATTAGGATACCTAGC	
Spy49_1659c_for_ UTR	CTTAAGTAGTATAATGAAAGCG	Amplifikation einer 1,14 kb Genregion bestehend aus <i>Spy49_1658c</i> bis <i>Spy49_1659c</i> ; zusätzlich 118 nt 5'UTR und 31 nt 3'UTR
Spy49_1658c_rev_ UTR	CAGTCTGAAACAACCTTGATTTTCC	
Spy49_1657_for Spy49_1657_rev	GGAAAGTCAACCTTAGCACG TTGTCAGCCATATCAGGACG	Amplifikation 308 bp Genfragment aus <i>Spy49_1657</i>
Spy49_1660_for Spy49_1660_rev	GCGCATTCGACATTTACAGC TGATGGAATGTCAAGGAGGC	Amplifikation 318 bp langer Abschnitt aus <i>Spy49_1660</i>
16S_for	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	Amplifikation 1511 bp langer Abschnitt aus <i>Spy49_rRNA16s4</i> zur Generierung 16S-rRNA Sonde
16S_rev	GGTTACCTTGTACGACTT	

2.6.8. PCR und Gelelektrophorese**2.6.8.1. Amplifikation spezifischer DNA-Bereiche**

DNA-Abschnitte unter 2.000 bp wurden mit Hilfe von *Thermus aquaticus*-Polymerase (Taq-Polymerase) von Qiagen in einer PCR vervielfältigt. Die Ansätze setzten sich dabei aus folgenden Komponenten in den angegebenen Endkonzentrationen zusammen: gDNA (1-15 ng/μl); Primer (0,4 μM); PCR-Puffer (mit 1,5 mM MgCl₂; Qiagen); Q-Solution (Qiagen); MgCl₂ (0,5 mM; Qiagen); dNTPs (0,2 mM; Fermentas); Taq-Polymerase (50 mU/μl; Qiagen).

Zur Amplifikation von Bereichen über 2.000 bp und von DNA-Fragmenten zur Deletion von *Spy49_1658c* wurde Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase von Finnzyme (Thermo Fisher Scientific) in einer Endkonzentration von 8 mU/μl verwendet. Auch hier wurde gDNA, Primer, Q-Solution und dNTPs in den bereits erwähnten Endkonz. eingesetzt. Als Puffer diente Phusion® HF Puffer mit 1,5 mM MgCl₂ (Thermo Fisher Scientific). Allerdings erfolgte hier keine zusätzliche Zugabe von MgCl₂.

Falls nicht anders angegeben, beinhalteten PCR-Programme folgende Angaben zu Temperatur, Dauer sowie Anzahl der Wiederholung:

Schritt 1) Initiale Denaturierung der DNA-Doppelhelix bei 95°C für fünf min

Schritt 2) erneute Denaturierung der DNA bei 95°C für 45 Sekunden

Schritt 3) Anlagerung des Primerpaars für 45 Sekunden, Temp. fünf bis 10°C geringer als Schmelztemp. des Primerpaars

Schritt 4) Synthese des Nukleotidstrangs durch dNTP-Anlagerung und -Verknüpfung bei 72°C, Synthesedauer von Länge des zu amplifizierenden Fragments und verwendeter Polymerase abhängig (Qiagen Taq-Polymerase 1.000 bp pro Minute; Phusion® High-Fidelity Polymerase 1.000 bp in 30 Sekunden)

Schritt 5) finale Verlängerung des synthetisierten DNA-Abschnittes für fünf bis 10 min bei 72°C

Schritt 6) Abkühlung der Ansätze auf 4°C

Zur exponentiellen Vervielfältigung des generierten DNA-Fragments wurde Schritt zwei bis vier 30mal wiederholt.

2.6.8.2. Elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten

Die Auftrennung von Fragmenten über 300 bp erfolgte in 1 %igen (w/v) und von DNA-Abschnitten von 50-400 bp in 2 %igen Agarosegelen bei 120 V. Hierfür wurden die PCR-Produkte zusammen mit Ladepuffer [1,7 mM TRIS-HCl (pH 7,6); 0,005 % (w/v) Bromophenolblau; 0,05 % (w/v) Xylenzanol; 10 % (v/v) Glycerol; 10 mM EDTA; Fermentas] aufgetragen und bei 120 Volt aufgetrennt.

2.6.8.3. Herstellung von Agarosegelen

Agarosegele wurden mit 1 x TAE-Puffer angesetzt, welcher auch als Laufpuffer für die elektrophoretische Auftrennung diente. Zur Visualisierung der DNA wurden die Gele nach der Elektrophorese in Ethidiumbromid (1,5 µg/ml) gebadet. Anschließend erfolgte die Anregung des interkalierten Fluoreszenzfarbstoffes Ethidiumbromid mit UV-Licht und Dokumentation mittels Intas Science Imaging Instruments.

2.6.8.4. *emm*-Typisierung nach CDC-Norm

Ein von der amerikanischen Gesundheitsbehörde (CDC) verfasstes Protokoll zur *emm*-Typisierung von GAS-Stämmen wurde hier zur Differenzierung und zur Kontrolle der verwendeten Wildtyp- und Mutantenstämme genutzt. PCR-Ansätze enthielten gDNA, Primer, dNTPs, Puffer und Taq-Polymerase in den bereits erwähnten Endkonzentrationen. Das Programm zur Vervielfältigung eines Abschnittes aus dem *emm* Gen war wie folgt aufgebaut:

94°C	60 s	
94°C	15 s	
46,5°C	30 s	} 10 Zyklen
72°C	75 s	
94°C	15 s	
46,5°C	30 s	} 20 Zyklen
72°C	75 s; schrittweise Verlängerung um 10 s je Zyklus	
72°C	10 min	
4°C	Pause	

2.6.8.5. Synthese von DNA-Sonden

Für die Identifizierung spezifischer DNA-Abschnitte im Genom von *S. pyogenes* wurden Southern-Blot-Analysen durchgeführt. Der Nachweis spezifischer RNA-Sequenzen erfolgte mittels Northern-Blot. Für beide Methoden erfolgte die Generierung von Digoxigenin-markierten DNA-Sonden mittels einer PCR. In den PCR-Ansätzen wurde DIG 11 dUTP in einer Endkonz. von 20 µM eingesetzt. Im Anschluss erfolgte die Auswertung der Sonden-PCR mittels Gelelektrophorese und die Aufreinigung der Sonden mittels Qiagen Gelextraktionskit (s. 2.6.8.7.).

2.6.8.6. Kolonie-PCR bei *E. coli*

Zellmaterial einer einzelnen Kolonie oder eines Ausstriches wurde hierfür direkt in einen PCR-Ansatz übertragen. Für den Zellaufschluss wurde der initiale Denaturierungsschritt auf 10 min verlängert.

2.6.8.7. Nachweis rekombinanter Sequenzen in *S. pyogenes*

Zu Beginn erfolgte ein enzymatischer Mureinabbau mit Hilfe von PlyC, das Lysin der Streptokokken Bakteriophagen C₁, (Nelson *et al.* 2006). Hierfür wurden über-Nacht-Kulturen (max. 5 ml) bei 3345 x g zentrifugiert und in 1 ml PBS mit 126,4 ng/ml PlyC (zur Verfügung

gestellt von Vince Fischetti und Daniel Nelson, Rockefeller University, New York, USA) aufgenommen und für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Die Inaktivierung von PlyC und der Zellaufschluss erfolgten bei 95°C für 10 min. Grobe Zellbestandteile wurden durch einen 1-minütigen Zentrifugationsschritt bei 16.006 x g entfernt. 1 µl einer 1:10 Verdünnung der Nukleinsäurelösung wurde für einen 50 µl PCR-Ansatz verwendet.

2.6.8.8. Aufreinigung von PCR-Produkten

Mittels QIAquick Gelextraktions- und PCR Aufreinigungskit wurden PCR-Produkte zur Verwendung für weitere molekularbiologische Methoden nach Herstellerangaben gereinigt. Die Eluierung der gesäuberten DNA erfolgte stets mit sterilem A. bidest. Die gereinigten Proben wurden bei -20°C gelagert.

2.6.9. Ligation von DNA-Fragmenten

Zur kovalenten Verknüpfung von DNA-Fragmenten wurde T4-DNA-Ligase (Roche) verwendet. Das Enzym verknüpft unter ATP-Verbrauch freie 5'-Phosphatgruppen mit 3'-Hydroxylgruppen. Für einen 20 µl Reaktionsansatz wurden ein U Ligase, sowie ein Insert-Plasmid-Verhältnis von 3:1 eingesetzt. Zur Berechnung der notwendigen Menge an Insert-DNA wurde folgende Formel zur Hilfe genommen.

$$m_{\text{Insert}} [\text{ng}] = \frac{m_{\text{Vektor}} [\text{ng}] \times \text{GrößeFragment} [\text{bp}]}{\text{GrößeVektor} [\text{bp}]} \times 3 [\text{Verhältnissfaktor}]$$

2.6.10. Dephosphorylierung von Vektor-DNA mit Hilfe alkalischer Phosphatase

Bei Ligationsversuchen zur Identifizierung der Tn*Spc*-Insertionsstelle mittels der „SiteFinding“-Methode (s. 2.7.2.) wurden Plasmid- und Insert-DNA nur mit dem Restriktionsenzym *NotI* geschnitten. Um eine Religation des Vektors pBlueSkript II KS (+) zu verhindern, wurde dieser mit rAPid alkalischer Phosphatase am 5'-Ende dephosphoryliert. Hierfür wurde max. ein µg *NotI*-geschnittener Vektor mit zwei U alkalischer Phosphatase in insgesamt 40 µl Probenvolumen für 20 min bei 37°C behandelt. Zur Inaktivierung der Phosphatase wurden die Proben für zwei min bei 75°C inkubiert. Anschließend wurde der Vektor direkt für eine Ligation eingesetzt oder bis zu seiner Verwendung bei -20°C gelagert.

2.6.11. Transformation kompetenter *E. coli* mit Plasmid-DNA

2.6.11.1. Herstellung kompetenter *E. coli*

Zur Herstellung kompetenter *E. coli* Zellen wurde das Protokoll nach Kushner (Kushner S. R. 1978) genutzt. Sämtliche Zentrifugationsschritte erfolgten bei 3345 x g und 4°C für 10 min. Desweiteren wurde alle Arbeitsschritte auf Eis durchgeführt und sämtliche Lösungen auf 4°C abgekühlt. Über-Nacht-Kulturen wurden in 100 ml frischen LB-Medium 1:50 verdünnt und bei 37°C und 180 Upm bis zu einer OD_{540nm} von ca. 0,8 kultiviert. Danach wurden die Kulturen auf zwei 50 ml Gefäße aufgeteilt. Anschließend erfolgte die Zellernte und die Aufnahme des gewonnen Zellpellets in jeweils 20 ml von Lösung 1 (Tab. 5). Erneut wurden die Zellen abzentrifugiert und das erhaltene Pellet in jeweils 20 ml von Lösung 2 (Tab. 5) gelöst. Auf Eis wurden die Proben für weitere 30 min gekühlt und abermals zentrifugiert. Zum Schluss wurden die Zellen in jeweils 5 ml von Lösung 2 mit 20 % (v/v) Glycerin aufgenommen und Teilmengen von jeweils 500 µl auf Reaktionsgefäße von 1,5 ml Gesamtvolumen aufgeteilt. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

Tab. 5: Zusammensetzung von 10x MOPS Puffer sowie Lösung 1 und 2.

MOPS Puffer, Lösung1 und 2 wurden zur Herstellung von kompetenter *E. coli* Zellen genutzt.

10x MOPS	
MOPS Puffer; pH 7,0 (mit NaOH)	0,2 M
Natriumazetat (steril)	50,0 mM
EDTA	10,0 mM
Lösung 1 (50 ml)	
10x MOPS	2,5 ml
Rubidiumchlorid (0,1 M)	10 mM
Lösung 2 (50 ml)	
10x MOPS	25 ml
Rubidiumchlorid (0,1 M)	10 mM
Kalziumchlorid (1 M)	50 mM

2.6.11.2. Hitzeschocktransformation

Mittels des Hitzeschockverfahrens wurden *E. coli* Zellen, des Stammes DH5'α, mit rekombinanten Plasmidkonstrukten transformiert. Dabei wurden 100 µl kompetente Zellen auf Eis aufgetaut. Anschließend wurden 10 µl des Ligationsansatzes zugegeben und das Gemisch für weitere 30 min auf Eis inkubiert. Bei 42°C im Wasserbad erfolgte für 30

Sekunden die Hitzeschockbehandlung zur Aufnahme von Fremd-DNA. Zur Regenerierung wurde der Ansatz für fünf Minuten auf Eis gelagert, 300 µl LB-Medium hinzugefügt und für ein bis zwei Stunden bei 37°C und 180 Upm inkubiert. Auf entsprechenden antibiotikahaltigen LB-Agarplatten erfolgte im Anschluss die Anzucht von transformierten *E. coli* Zellen bei 37°C für 16-20 Stunden.

2.6.12. Elektroporation von GAS

Die Anzucht von *S. pyogenes*-Stämmen erfolgte bei 37°C und 20 % O₂/5 % CO₂ sowie alle Zentrifugationsschritte bei 3345 x g für fünf min. Alle verwendeten Lösungen oder Medien wurden durch Autoklavieren oder Filtration sterilisiert und mit Ausnahme der Medien auf 4°C abgekühlt.

Von M18 8232 und M49 591 wurden Vorkulturen in THY mit 10 mM Glycin über Nacht angezogen, anschließend mit THY/10 mM Glycin/0,125 M Sukrose/1600 U Mutanolysin 1:16 verdünnt und weitere 16 h inkubiert. Zur Gewinnung des Zellpellets wurden die Kulturen zentrifugiert und im Fall von Serotyp M18 in 1 x PBS mit Hyaluronidase (500 U/ml) aufgenommen und eine Stunde bei 37°C inkubiert. Die Behandlung mit Hyaluronidase diente zur Entfernung von hyaluronsäurehaltigen Kapselstrukturen, welche bei Serotyp M18 aber nicht bei M49 verstärkt vorhanden waren. Zellen des Serotyps M49 wurden nach dem Zentrifugationsschritt in 0,625 M Sukrose aufgenommen und ein weiteres Mal mit Sukrose gewaschen. Im Anschluss an die Hyaluronidasebehandlung bzw. dem Waschschrift mit 0,625 M Sukrose erfolgte eine erneute Zentrifugation und Pelletaufnahme in PBS. Dieser Vorgang wurde zweimal mit PBS wiederholt und anschließend einmal mit 0,625 M Sukrose. Zum Schluss wurde das Pellet in 1 bis 2 ml 0,625 M Sukrose aufgelöst und in Teilmengen von jeweils 100 µl auf 1,5 ml Gefäße verteilt. Die Lagerung elektrokompenter GAS-Zellen erfolgte bei -80°C.

Zur Elektroporation wurden Aliquots von 100 µl an kompetenten Zellen auf Eis aufgetaut und mit 1-3 ng der jeweiligen Plasmidlösung (pMGC57-spc bzw. pASK-IBA3c_ko*Spy49_1658c*) versehen. Nachdem das Gemisch aus bakteriellen Zellen und Plasmidkonstrukt für maximal 10 Minuten bei 4°C inkubierte, erfolgte die Elektroporation im EquiBio Easyject Plus von PeqLab (folgende Parameter: 1750 V; 481 Ω; 25 µF für 12 ms). Es wurden Elektroporationsküvetten mit einem Elektrodenabstand von 2 mm (PeqLab Biotechnologie GmbH) verwendet. Zur Regenerierung der GAS-Zellen erfolgte die Zugabe von jeweils 1 ml THY/0,125 M Sukrose je Elektroporationsansatz und Inkubation für mindestens drei Stunden bei 37°C. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet und in frischem

THY-Medium resuspendiert. Zur Selektion plasmidtragender GAS-Zellen wurden die Ansätze auf THY-Platten mit 60 µg/ml Spektinomycin ausplattiert.

2.7. Identifizierung der *TnSpc*-Insertionsstellen

2.7.1. Dye Terminator PCR

Das Prinzip der Dye Terminator PCR bestand in der Amplifikation von unbekannten DNA-Sequenzen, welche *TnSpc* unmittelbar flankierten. Die hierfür verwendeten Primer aad9_for1 bzw. tnp_rev1 binden innerhalb bekannter Sequenzen der Spektinomycinkassette bzw. der Transposase von IS256. Durch Anlagerung freier fluoreszenzmarkierter Nukleotide wurden DNA-Fragmente synthetisiert, welche aus *TnSpc* hinaus- und in unbekannte Regionen hineinreichten. Die anschließende Sequenzierung der PCR-Produkte erfolgte mit einem ABI 377 Sequenzierautomat.

ABI PRISM™ BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit sowie 0,5-1 µg gDNA, 15 µM Primer aad9_for1 (o. tnp_rev1) und 375 mM Betain dienten zum Ansatz der PCR-Proben mit einem Gesamtvolumen von 20 µl. Das Thermocycler-Programm setzte sich aus folgenden Parametern zusammen:

95°C	5 min	
95°C	30 s	} 99 Zyklen
50°C	20 s	
60°C	4 min	
4°C	Pause	

Nicht eingebaute Dye Terminatoren wurden mittels DyeEx 2.0 Kit von Qiagen nach Herstellerangaben entfernt. Danach wurden die Proben in einer Vakuumzentrifuge für 20 min bei mittlerer Geschwindigkeit getrocknet und anschließend in jeweils 20 µl Hi-Di Formamid (Applied Biosystems) gelöst. Zum Aufschmelzen der Doppelstränge wurden die Proben für drei min auf 95°C erhitzt und bis zur Sequenzanalyse bei 4°C aufbewahrt.

2.7.2. „SiteFinding“-PCR nach Tan *et al.* (2005)

Als eine weitere Methode zur Identifizierung von *TnSpc*-Insertionsstellen im Genom von *S. pyogenes* wurde die „SiteFinding“-PCR nach Tan *et al.* (2005) angewandt. Diese Methode war zwar weniger kostenintensiv dafür aber zeitaufwendiger als die Dye Terminator PCR.

Zur Initiation der „SiteFinding“-PCR erfolgte in einem ersten Schritt die Anlagerung des degenerierten Primers SF_A bzw. SF_B bei geringen Temperaturen, wobei die vier Nukleotide am 3'-Ende GCCT für eine höhere Primerspezifität sorgten. In einem zweiten Schritt wurden SF_P1, welcher innerhalb SF_A bzw. SF_B bindet, und ein *TnSpc*-spezifischer Primer (*aad9_for1* o. *tnp_rev1*) zur exponentiellen Amplifikation von *TnSpc*-flankierenden Regionen hinzugefügt. Eine anschließende „Nested“-PCR mit den Primerpaar SF_P2/*aad9for_SF* (o. SF_P2/*tnprev_SF*) sollte die Spezifität und damit die Konz. an *TnSpc*-flankierenden DNA-Abschnitten nochmals erhöhen.

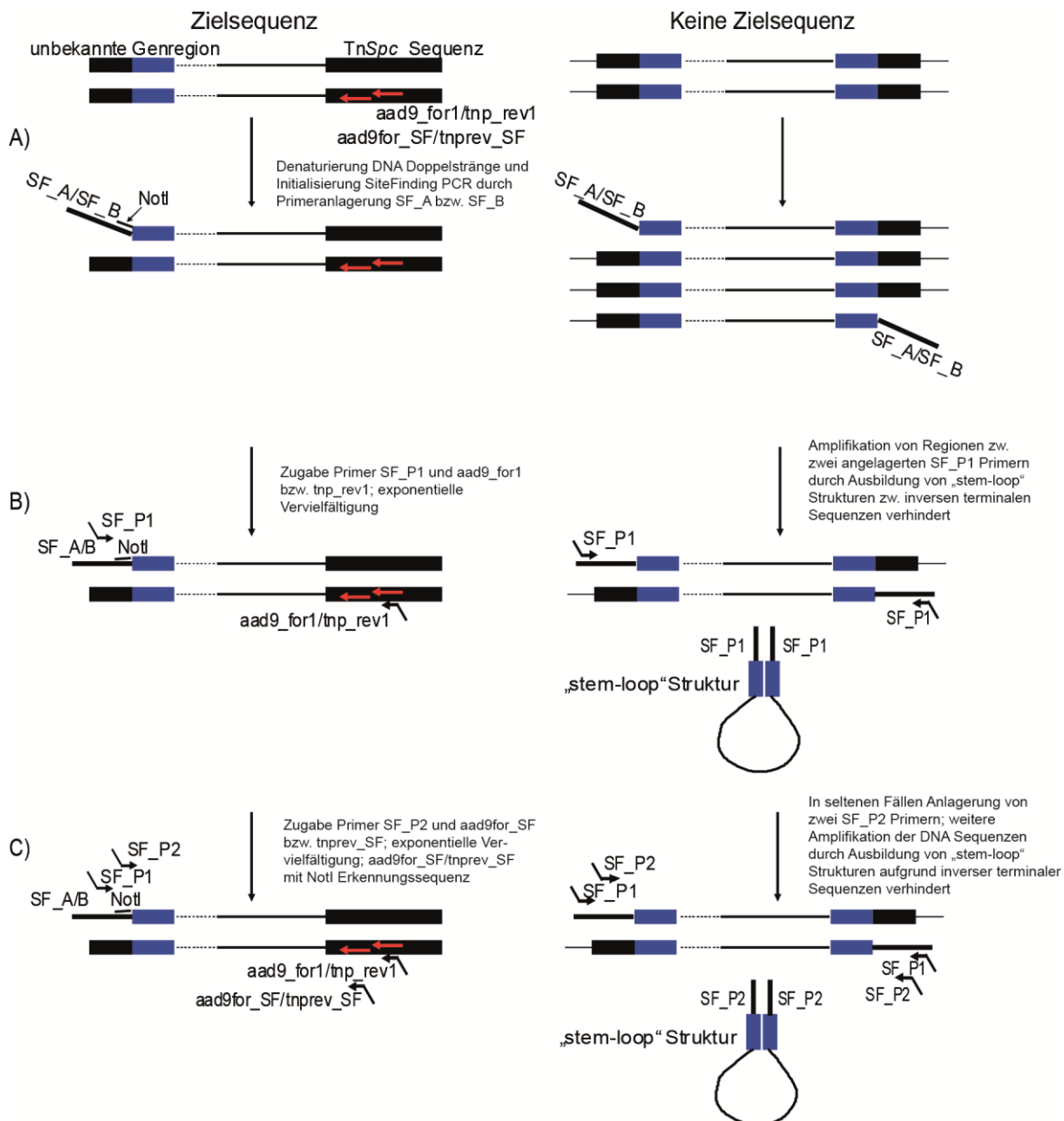


Abb. 2: Methodische Zusammenfassung der „SiteFinding“- und Nested-PCR nach Tan et. al.

A) Anlagerung von Primer SF_A oder SF_B zur Initialisierung der „SiteFinding“-PCR. SF_A/B enthalten die Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym NotI und am 3'-Ende

die für spezifische Basenpaarung verantwortliche Sequenz GCCT (blau hervorgehoben). B) Nach Anlagerung der „SiteFinder“-Primer erfolgte durch Zugabe von SF_P1 und aad9_for1/tnp_rev1 eine exponentielle Amplifikation spezifischer *TnSpc*-flankierender Regionen. DNA-Abschnitte zwischen zwei „SiteFinder“-Primer bildeten durch inverse terminale Sequenzen „stem-loop“-Strukturen, welche eine weitere Amplifikation behinderten. C) „Nested“-PCR mit Primer SF_P2 und aad9for_SF/tnprev_SF welche innerhalb der „SiteFinder“-Sequenz bzw. *TnSpc* banden. Unterbindung der exponentiellen Amplifikation von DNA-Abschnitten zwischen zwei SF_P2 Primern erfolgte durch Ausbildung von „stem-loop“-Strukturen. aad9for_SF bzw. tnprev_SF am 5'-Ende mit Erkennungssequenz für NotI.

Die zur Initialisierung der „SiteFinding“-PCR vorbereiteten Ansätze enthielten max. 30 ng gDNA, 0,4 U Phusion® High-Fidelity Polymerase (Thermo Fisher Scientific), 125 µM dNTPs, High-Fidelity Puffer (Thermo Fisher Scientific) und jeweils 2 µl Primer SF_A oder SF_B in den Konz. 100 pM, 1 nM und 10 nM. Mit sterilem A. bidest wurde das Probevolumen auf 20 µl aufgefüllt. Das Programm zur „SiteFinding“-PCR setzte sich aus folgenden Schritten zusammen:

98°C	2 min	
98°C	30 s	
25°C	1 min	
72°C	4 min	Anstieg von 25°C auf 72°C mit 0,15°C je Sekunde
4°C	10 min	Zugabe von Primer SF_P1 und aad9_for1/tnp_rev1
98°C	2 min	
98°C	25 s	} 39 Zyklen
55°C	25 s	
72°C	75 s	
72°C	7 min	
8°C	Pause	

Während der 10-minütigen Inkubationspause bei 4°C (Schritt 5) erfolgte die Zugabe von jeweils 1 µl Primer SF_P1 und 0,25 µl Primer aad9_for1 (bzw. tnp_rev1; Konz. von SF_P1 und aad9_for1/tnp_rev1 100 µM), 1 µl 5 x High-Fidelity Puffer und 2,75 µl steriles A. bidest. Nach Beendigung der „SiteFinding“-PCR wurden die PCR-Produkte durch Elektrophorese (s. 2.6.8.2.) in einem 1 %igen Agarosegel aufgetrennt. Für die „Nested“-PCR wurden ausschließlich Ansätze mit Produktlängen von 500 bp bis 2 kbp verwendet. Dafür wurden diese 1:500 mit sterilem A. bidest verdünnt, jeweils 1 µl diente als Vorlage für einen 50 µl PCR-Ansatz. Als Polymerase wurde Qiagen Taq-Polymerase eingesetzt, als Primerpaar diente SF_P2/aad9for_SF o. SF_P2/tnprev_SF (Zusammensetzung PCR-Ansatz Abschnitt 2.6.8.1.). Die Primer-Anlagerung erfolgte bei 55°C für 45 Sekunden und die Verlängerung des Nukleotidstrangs für 90 Sekunden. Zur exponentiellen Vermehrung der synthetisierten DNA-Abschnitte wurden 35 Zyklen durchgeführt. Nach elektrophoretischer Auftrennung der PCR-

Produkte wurden diese mit Hilfe eines QIAquick PCR Aufreinigungskits (Qiagen; s. 2.6.8.4.) aufgearbeitet und zur Klonierung in pBlueSkript II KS (+) über Nacht mit *NotI* bei 37°C geschnitten. Der Ansatz besaß ein Gesamtvolumen von 80 µl, wobei 45 µl das gereinigte PCR-Produkt ausmachten, 1 µl *NotI* (10 U/µl; Roche), 8 µl Puffer (10 x; Roche) und das Restvolumen mit sterilem A. bidest aufgefüllt wurden. Zur Entfernung störender Salze und Enzyme wurden die Proben mit Hilfe des QIAquick Gelextraction Kit (Qiagen; s. 2.6.8.7.) aufgereinigt. Es folgte die Ligation des PCR-Produktes in den *NotI*-geschnittenen und dephosphorylierten Vektor pBlueSkript II KS (+) (s. 2.6.9. und 2.6.10.) und Hitzeschocktransformation von *E. coli* DH5'α mit dem generierten Plasmidkonstrukt (s. 2.6.11.2.). Positive Klone wurden auf LB-Agarplatten mit 100 µg/ml Ampizillin (Sigma Aldrich) selektiert und in einer Kolonie-PCR (s. 2.6.8.6.) mit M13 Primern bestätigt. Wurde kein Insert in den Vektor integriert, entstanden DNA-Fragmente mit einer Länge von ca. 230 bp. Plasmide mit amplifizierten DNA-Fragmenten größer als 500 bp wurden zur Sequenzierung an die Firma GATC Biotech AG (Konstanz Deutschland) gesandt. Die Sequenzierung erfolgte mit Primer M13_for (bzw. M13_rev).

2.8. Genotypisierung mittels Southern- /Northern-Blot Analysen und RT-PCR

Der Nachweis spezifischer DNA- bzw. RNA-Fragmente aus Gesamtzellextrakten erfolgte nach der Methode von Alwin *et al.* (1977). Nukleinsäurelösungen wurden mit Hilfe der Gelelektrophorese aufgetrennt und anschließend durch das so genannte Blotverfahren auf eine Trägermatrix (Nylonmembran) übertragen. Nach Fixierung von DNA bzw. RNA erfolgte die Hybridisierung mit spezifischen Digoxigenin-markierten DNA-Sonden (Synthese siehe 2.6.8.5.) und Detektion der Chemilumineszenz auf einem Röntgenfilm.

Alternativ zum Northern-Blot Verfahren wurden spezifische Gentranskripte durch eine PCR nach reverser Transkription der Gesamt-RNA nachgewiesen.

2.8.1 Auftrennung Gesamt-DNA

Nachdem gDNA von *S. pyogenes* mit dem Restriktionsenzym *PstI* geschnitten und anschließend durch alkoholische Fällung gereinigt wurde (s. Abschnitt 2.6.4. und 2.6.5.), erfolgte die Auftrennung der einzelnen Fragmente bei 60 V für zwei Stunden. Hierfür wurden 0,7 %ige Agarosegele verwendet. Zur Bestimmung der Fragmentgrößen dienten 200 ng eines Digoxigenin-markierten DNA-Größenstandards (Roche; DNA Molecular Weight Marker II).

2.8.2. RNA-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von RNA-Proben wurde ein denaturierendes Agarosegel vorbereitet. 300 mg Agarose (Serra) wurden in 30 ml 1 x MOPS (s. 2.6.10.1.) mit 1,7 % Formaldehyd (Roth; v/v) aufgelöst. Bei 4°C polymerisierte das Gel über Nacht. Fünf µg Gesamtzell-RNA wurden mit Ladepuffer [Formamid (59 %; v/v; Roth); Formaldehyd (7,6 %; v/v; Roth); 1,2 x MOPS; Ethidiumbromid (0,8 µg/ml; Sigma-Aldrich)] 1:6 verdünnt und anschließend bei 60°C für 10 min denaturiert. Das ausgehärtete Agarosegel wurde ohne Probenzusatz bei 110 V für 30 min an das Spannungsgerät angeschlossen, danach erfolgte die Proben-Auftrennung bei 50 V für drei Stunden. Als Laufpuffer diente 1 x MOPS mit 0,7 % Formaldehyd (v/v; Roth) in DEPC-H₂O und als Größenstandard ein µg peqGold High Range RNA-Leiter (PEQLAB).

2.8.3. Kapillarblotverfahren zum Transfer von DNA-Fragmenten

Zur Übertragung aufgetrennter DNA-Abschnitte wurde das Prinzip des Kapillarblots genutzt. Hierfür wurden Agarosegele jeweils zweimal für acht min in 0,25 M HCl, für 20 min in Denaturierungspuffer (1,5 M NaCl; 0,5 M NaOH) und für 15 min in Neutralisierungspuffer [1,5 M NaCl; 0,5 M TRIS-HCl (pH 7,5)] gebadet. Anschließend erfolgte der Transfer auf eine positiv geladene Biotodyne® Nylon-Membran (Pall Corporation) durch Kapillarkräfte mit 5 x SSC über Nacht.

2.8.4. Übertragung von RNA mittels Vakuumbloit

Nach der Gelelektrophorese wurden Agarosegele zweimal für jeweils 15 min in 0,2 M NaOH gebadet und anschließend mit Transferpuffer (5 x SSC) gespült. Mit Hilfe eines Vakuumbloiters (Biometra) erfolgte der Nukleinsäuretransfer auf die amphotere Trägermatrix Biotodyne® Nylon-Membran (Pall Corporation) für ca. 90 min.

2.8.5. Fixierung gebundener Nukleinsäuren an Nylon-Membranen

Zur kovalenten Verknüpfung übertragener DNA- bzw. RNA-Moleküle an die Trägermatrix, wurde diese für zwei min mit UV Licht (305 nm) bestrahlt.

2.8.6. Sonden-Hybridisierung und Detektion

Die Membran wurde für eine Stunde bei Hybridisierungstemp. (40-50°C; je nach G/C-Gehalt der eingesetzten Sonden) in DIG Easy Hyb Lösung (Roche) inkubiert. Danach erfolgte ein Austausch der Pufferlösung und die Zugabe denaturierter Sonden-DNA (Endkonz. 8 ng/ml). Zur Denaturierung wurden die Sonden auf 95°C für 10 min erhitzt und bis zur Verwendung auf Eis gelagert. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht. Danach wurde die Membran zweimal für jeweils fünf min in 2 x SSC/0,1 % SDS (w/v) bei RT und zweimal für jeweils 15 min in 0,1 x SSC/0,1% SDS (w/v) bei Hybridisierungstemp. gebadet. Alle weiteren Waschschrte bis zur Sondendetektion erfolgten bei RT. Zur Entfernung von SDS-Rückständen wurde die Membran für eine min in Waschpuffer geschwenkt. Anschließend folgte eine 30-minütige Inkubation in Puffer 2 zur Sättigung unspezifischer Bindungsstellen für die nachfolgende Behandlung mit Alkalischer-Phosphatase (AP) konjugiertem Anti-DIG-Fab-Fragment (Roche). Hierfür wurde ein Pufferaustausch durchgeführt und nach Zugabe von Anti-DIG-AP (Endkonz. 75 mU/ml) die Membranen für weitere 30 min inkubiert. Es folgten drei Waschschrte für jeweils fünf min sowie Equilibrierung der Membran in Puffer 3. Zur Detektion wurde die Membran zwischen zwei durchsichtige Folien platziert und mit CSPD (Roche; 1:100 verdünnt mit Puffer 3) überschichtet. Zur Signalverstärkung erfolgte eine 15-minütige Inkubation bei 37°C. Der Röntgenfilm (Agfa Gevaert N. V.) wurde zur Belichtung auf die Membran aufgelegt, dafür wurde eine lichtundurchlässige Röntgenfilmkassette (Konika Minolta) verwendet. Die Entwicklung des Röntgenfilms erfolgte in einem automatischen Entwickler von Agfa Gevaert N. V. (Typ Curix 60). Entwickler und Fixierer stammten von der Firma Agfa Gevaert N. V. und wurden nach Herstellerangaben angesetzt.

Tab. 6: Zusammensetzung der zu Southern/Northern-Blot Analysen eingesetzten nicht-kommerziellen Pufferlösungen.

<u>Waschpuffer</u>	
<u>Puffer 1</u>	
Tween® 20	0,3 % (v/v)
<u>Puffer 1; pH 7,5</u>	
Maleinsäure	0,1 M
NaCl	0,15 M
<u>Puffer 2</u>	
<u>Puffer 1</u>	
Blockingreagenz (Roche)	1 % (w/v)

Fortsetzung Tab. 6:**Puffer 3; pH 9,5**

TRIS Trizma® Base	0,1 M
NaCl	0,1 M
MgCl ₂ x 6H ₂ O	50 mM

2.8.7. RT-PCR

Zusätzlich erfolgte der Nachweis spezifischer Gentranskripte mittels RT-PCR. In einem ersten Schritt wurde Gesamtzell-RNA (s. 2.6.2.) zur Entfernung von DNA-Kontaminationen mit DNase I (Epicentre®) behandelt. Die Konz. an DNase I betrug dabei 1 U/μg RNA. Nach 16-18 Stunden bei 37°C wurde der enzymatische DNA-Abbau durch eine 10-minütige Inkubation bei 65°C gestoppt.

Für die folgende cDNA-Synthese wurde SuperScript™ First-Strand Synthese System für RT-PCR (Invitrogen) mit Random-Hexamer-Primer verwendet. Dabei wurde wie vom Hersteller empfohlen vorgegangen.

Für die im Anschluss folgende PCR betrug die Endkonzentration der eingesetzten cDNA 0,8 ng/μl. Alle weiteren Komponenten wurden mit den im Abschnitt 2.6.8. angegebenen Endkonzentrationen hinzugefügt. Abweichend vom allgemeinen PCR-Protokoll wurden zur exponentiellen Vervielfältigung 35-40 Zyklen verwendet. Die Auswertung erfolgte durch Auftrennung der synthetisierten DNA-Fragmente in einer Gelelektrophorese.

2.9. Virulenz-relevante Phänotyp-Analysen**2.9.1. Selektion von Tn*Spc*-Mutanten auf oxidativen und AMP-Stress**

Die hier beschriebenen Versuchsdurchführungen zur Auswahl von Tn*Spc*-Insertionsmutanten mit einem virulenzrelevanten Phänotyp wurden im 96-Well-Format vorgenommen. Die Auswahl subletaler Konz. an H₂O₂ und Menadion für *S. pyogenes* WT-Stämme richtete sich nach Thibessard *et al.* 2001 und 2004.

Nachdem die kompletten Tn*Spc*-Mutantenbanken auf Eis aufgetaut wurden, erfolgte der Transfer mit Hilfe von Replikatoren (96-Well-Replikator; Sigma-Aldrich) auf 96-Well-Platten mit frischem Medium und anschließender Bebrütung über Nacht. Zur Selektion wurden stationäre Kulturen mit Hilfe der Replikatoren auf Stressagarplatten übertragen. Zusätzlich wurde das Hämolyseverhalten auf Agarplatten mit 7 % Schafsblut (Oxoid) analysiert. Der Hämolyse-nachweis diente als interne Kontrolle für die β-hämolisierenden

Streptokokken sowie als Qualitätskontrolle für die generierten Mutantenbanken (mind. 4-fache Genomabdeckung). Um Wachstumsdefizite als Ursache für ein verändertes Toleranzverhalten auszuschließen, wurden zusätzlich Agarplatten ohne Zusätze beimpft. Alle Platten wurden für ca. 20 h im Brutschrank inkubiert.

Nachdem *TnSpc*-Mutanten mit einem distinkten Phänotyp auf separaten 96-Well-Platten in Form von drei unabhängigen Wiederholungen selektiert wurden, erfolgte in zwei Wiederholungsrunden eine Kontrolle des beobachteten Phänotyps. Dabei wurde für Menadion ein Bereich von 15-60 µg/ml und für H₂O₂ ein Bereich von 3,5-5,0 mM abgedeckt. Zusätzlich zum Toleranzverhalten gegenüber oxidativen Stress wurde in den Wiederholungsrunden eine veränderte Sensitivität gegenüber Colistinsulfatsalz (Col; Sigma-Aldrich GmbH), stellvertretend für die Gruppe der antimikrobiellen Peptide, untersucht. Hierfür kamen Stressplatten mit ansteigenden Konz. von 30-90 µg/ml zum Einsatz.

2.9.1.1. Bestätigung der beobachteten Phänotypen

Stationäre Kulturen von GAS WT-Stämmen, *TnSpc*-Insertionsmutanten und *ΔSpy49_1658c* wurden einmalig mit sterilem 1 x PBS gewaschen und anschließend die optische Dichte im UV/Vis-Photometer bei 600 nm bestimmt. Mit 1 x PBS wurde die Zelldichte auf $6 \cdot 10^7$ KBE/ml für M18 und 10^8 KBE/ml für M49 (OD_{600nm} ca. 1,0 für beide Serotypen) eingestellt und serielle Verdünnungen von 10^0 bis 10^{-3} hergestellt. Agarplatten mit ansteigenden Konz. an Menadion, H₂O₂ und Colistin wurden 24 h vor Versuchsbeginn vorbereitet. Das Konzentrationsspektrum an Menadion betrug für Serotyp M18 30-80 µg/ml und für M49 30-70 µg/ml. H₂O₂ wurden für beide Serotypen in den Konz. 3-4,5 mM eingesetzt. Und von Colistin wurden für M18 Konz. von 70-120 µg/ml und für M49 50-70 µg/ml verwendet. Auf die Agarplatten wurden jeweils 10 µl der vorbereiteten Verdünnungsreihen aufgetropft und die Platten anschließend über Nacht bei 37°C und 5 % CO₂ bebrütet.

Bei *TnSpc*-Insertionsmutanten mit fehlendem Hämolyseverhalten wurden jeweils 5 µl der Verdünnungsstufen 10^{-3} bis 10^{-5} auf Columbia-Blutagarplatten aufgetropft.

2.9.1.2. Bestimmung der Überlebensraten in Gegenwart von H₂O₂, Menadion und Colistin

Über-Nacht-Kulturen des M49 Wildtyps und *ΔSpy49_1658c* wurden mit sterilem 1 x PBS gewaschen und in frischem Medium ohne Antibiotikazusatz bis zur frühen exponentiellen Wachstumsphase (OD_{600nm} zw. 0,3-0,5) angezogen. Anschließend wurden die Kulturen in

Aliquots von jeweils 500 µl in 1,5 ml Eppendorfgefäße überführt. Den Aliquots wurden die Stressoren H₂O₂, Menadion bzw. Colistin zugesetzt. H₂O₂ und Menadion, welche zur Induktion von oxidativen Stress dienen, wurden in den Endkonzentrationen von jeweils 0,5 mM und 600 µg/ml eingesetzt. Colistin wurde in einer Endkonzentration von 400 µg/ml verwendet. Ein Aliquot ohne Zusatz diente als Wachstumskontrolle. Zur Berechnung der Überlebensraten wurden durch serielle Verdünnung und Ausplattierung der Verdünnungsreihen die Ausgangs-KBE vor Zugabe der Stresssubstanzen ermittelt. Nach zwei-stündiger Inkubation bei 37°C erfolgte die Ermittlung vitaler KBE unter den jeweiligen Stressbedingungen und für die Wachstumskontrolle durch Ausplattieren der Verdünnungsreihen. Die Überlebensraten wurden nach folgender Formel berechnet:

$$S = \frac{KBE_n}{KBE_v} * 100\%$$

S = Überlebensrate [%]
 KBE_n = KBE nach Stressinduktion
 KBE_v = KBE vor Stressinduktion

2.9.2. Physiologische Charakterisierung von *Spy49_1658c::TnSpc* und *ΔSpy49_1658c*

2.9.2.1. Bestimmung Verbrauchsrate essentieller Aminosäuren

Über-Nacht-Kulturen des WT und der *Spy49_1658c::TnSpc* Stämme in THY ohne/mit Spektinomycin wurden mit CDM gewaschen und anschließend in CDM-Batch-Kulturen überführt. OD_{600nm} zum Zeitpunkt t₀ betrug ca. 0,06. Nach zwei Stunden erfolgte die erste Probenentnahme, stündlich bis zum Zeitpunkt t₆ wurden weitere Messungen vorgenommen. Die letzten Datenerhebungen erfolgten zum Zeitpunkt t₈. Es wurde die OD_{600nm}, der pH-Wert, die Trockenmasse und die essentiellen Aminosäuren gemessen.

Zur Bestimmung der Trockenmasse wurden jeweils 10 ml Probevolumen entnommen und die Zellen durch Zentrifugation bei 3345 x g für fünf min geerntet. Anschließend wurden die Zellpellets in 1 x PBS aufgenommen, die Zellsuspensionen in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und erneut zentrifugiert. Nach Abnahme der Überstände wurden die Proben in einer Vakuum-Tischzentrifuge getrocknet und das Gewicht bestimmt.

Die chromatografische Bestimmung der Aminosäurenkonzentrationen wurde mittels HPLC von Dr. Martijn Bekker an der Universiteit van Amsterdam (UvA), Department of Molecular Microbial Physiology vorgenommen. Jeweils 1 ml Probevolumen wurden zur Sedimentation bakterieller Zellen bei 3345 x g für 10 min zentrifugiert. Die Überstände wurden anschließend in 2,0 ml Reaktionsgefäße überführt und zur Aufbewahrung bei -20°C gelagert.

Zur Bestimmung der Ausgangskonzentrationen an Aminosäuren diente 1 ml des CDM Mediums.

2.9.2.2. Vergleich Wachstumsverhalten in THY, CDM und DMEM+GlutaMAX™

Stationäre Kulturen von *S. pyogenes* M49 WT und $\Delta Spy49_1658c$ in THY ohne/mit Spektinomycin wurden mit sterilem 1 x PBS gewaschen und anschließend zur Beimpfung von THY, CDM und DMEM+GlutaMAX™ genutzt, Start-OD_{600nm} von 0,08. Stündlich über acht Stunden erfolgte die Bestimmung der OD_{600nm} sowie eine pH-Messung. Nach 24 Stunden wurden zur Endpunktbestimmung letzte Datenpunkte erhoben.

Mit Hilfe von Excel wurden der Wachstumsverlauf sowie die Ansäuerung des Mediums über die Zeit grafisch dargestellt. Weiterhin wurden Verdopplungszeiten (td), Wachstums- (μ) und Azidifizierungsraten (dpH) in den verschiedenen Medien für den WT und $\Delta Spy49_1658c$ berechnet. DpH nach 8 bzw. 24 Stunden wurde angegeben als Anstieg der H⁺-Konz. im Verhältnis zur OD_{600nm}-Änderung, zur Bestimmung von td und μ siehe Abschnitt 2.4.2.

2.9.3. Bestimmung der Oberflächenhydrophobizität

Da eine veränderte bakterielle Zelloberflächenladung Einfluss auf das Toleranzverhalten gegenüber polaren Verbindungen, wie reaktive Sauerstoffverbindungen (ROS) oder einige AMP, besitzt, wurde die relative Hydrophobizität nach einer Methode von Courtney *et. al* (2009) für den WT M49 591 und $\Delta Spy49_1658c$ ermittelt. Dabei wurde folgendermaßen vorgegangen: Über-Nacht-Kulturen wurden zweimal mit sterilem 1 x PBS gewaschen und anschließend mit PBS die OD_{600nm} auf 1,0 eingestellt. Ein ml der Bakteriensuspension wurde mit 100 μ l Hexadecan (VWR) auf dem Vortex für mind. zwei Minuten vermischt. Zur Hexadecan-Behandlung wurden ausschließlich Reagenzröhrchen aus Glas verwendet. Zur Phasentrennung erfolgte ein 10-minütiger Inkubationsschritt bei RT. Die untere wässrige Phase diente nachfolgend zur OD_{600nm}-Bestimmung.

Aus der Differenz zwischen OD_{600nm} vor und nach Zugabe von Hexadecan ließ sich durch Verwendung folgender Formel der prozentuale Anteil der Oberflächenhydrophobizität berechnen:

$$H = \left[1 - \frac{OD_{600nm} \text{ nach}}{OD_{600nm} \text{ vor}} \right] * 100\%$$

H = Oberflächenhydrophobizität [%]
 OD_{600nm} nach = OD_{600nm} nach Hexadecanbehandlg.
 OD_{600nm} vor = OD_{600nm} vor Hexadecanbehandlg.

2.9.4. Wachstumsverhalten unter oxidativen und AMP-Stress

Untersucht wurden Konzentrationen an Menadion, hBD3, LL-37 und Protamin, welche zu einer 50 %igen Wachstumshemmung von WT M49 591 und $\Delta Spy49_1658c$ in THY führten. Hierfür wurden stationäre Vorkulturen einmalig mit sterilem 1 x PBS gewaschen und die optische Dichte auf ca. 0,1 bei 600 nm mit frischem THY-Medium eingestellt. Anschließend wurden im 96-Well-Format jeweils 100 μ l der Bakteriensuspensionen je Well vorgelegt und mit 100 μ l des jeweiligen Stressagens versehen. In Form einer geometrischen Reihe wurde für jede Substanz die Konz. schrittweise erhöht. Tabelle 7 gibt einen Überblick über das eingesetzte Konzentrationsintervall für die entsprechenden Substanzen.

Zur Wachstumskontrolle wurden Wells mit 100 μ l Bakteriensuspension und 100 μ l des jeweiligen Lösungsmittels vorgelegt. Für die Blindwertberechnung dienten Felder mit THY und A.bidest bzw. 10 mM Essigsäure/1 mg/ml BSA im Verhältnis 1:1.

Über einen Zeitraum von 12 Stunden erfolgte die Erfassung der optischen Dichte bei 600 nm in Abständen von 30 Minuten. Hierfür wurde ein Mikroplatten Lesegerät von Tecan verwendet.

Unterschiede in der Empfänglichkeit gegenüber den jeweiligen Stresssubstanzen wurden durch Berechnung des Verhältnisses der OD_{600nm}-Änderung verdeutlicht. Dabei wurde folgende Gleichung zur Hilfe genommen:

$$\text{Verhältnis OD}_{600\text{nm}}\text{-Änderung} = \frac{[\text{OD}_{600\text{nm}}(t = 12 \text{ h}) - \text{OD}_{600\text{nm}}(t = 0 \text{ h})]_{\text{Stress}}}{[\text{OD}_{600\text{nm}}(t = 12 \text{ h}) - \text{OD}_{600\text{nm}}(t = 0 \text{ h})]_{\text{Wachstumskontrolle}}} * 100\%$$

Tab. 7: Übersicht der verwendeten Stresssubstanzen.

Zusammensetzung und Konzentrationsintervall von Menadion zur Erzeugung von oxidativen Stress und verschiedenen AMPs.

Substanz	Lösungsmittel	Konzentrationsintervall
Menadion	A. bidest (steril)	4 – 64 μ g/ml
hBD3	10 mM Essigsäure; 1 mg/ml BSA	4 – 32 μ g/ml
LL-37	A. bidest (steril)	4 – 128 μ g/ml
Protamin	A. bidest (steril)	4 – 64 μ g/ml

2.9.5. Phagozytoseassay mit J774A.1 Monozyten-Makrophagen

Die Methode zur Quantifizierung der Menge an aufgenommenen und abgetöteten M49 *S. pyogenes* Zellen wurde nach Hampton und Winterbourn (Hampton and Winterbourn, 1999) modifiziert.

Über-Nacht-Kulturen vom WT und $\Delta Spy49_1658c$ wurden mit frischem Medium gewaschen und zum Ansatz neuer Kulturen mit einer Anfangs-OD_{600nm} von ca. 0,05 genutzt. Nachdem diese Kulturen die mittlere exponentielle Wachstumsphase erreicht hatten, wurde die Zellzahl auf ca. 10^7 Zellen/ml eingestellt. Im Anschluss wurden die Ansätze bei 3345 x g für 10 min zentrifugiert. Zur Opsonierung wurde das Bakterienzellpellet HBSS (10 mM PBS [pH 7,4], 1 mM CaCl₂, 0,5 mM MgCl₂, 1 mg/ml Glukose) mit 10 % humanem Serum (Sigma-Aldrich) aufgenommen und bei 37°C und 400 Upm für weitere 20 min im Schüttelinkubator KS 4000 I Control von IKA® inkubiert.

Zur Vorbereitung der Monozyten-Makrophagen Zellen J774A.1 wurden die Zellen eines konfluenten Monolayers durch Abschaben gewonnen, die Zelldichte mittels Zählkammer ermittelt und auf 10^7 Zellen/ml in DMEM+Pyruvat/10 % hiFCS (v/v) für eine MOI von ca. 1:1 (1:1,113) eingestellt.

Für den Phagozytose-Versuch wurden je Stamm zwei separate Reaktionsgefäße vorbereitet, wobei in Gefäß A) 835 µl der opsonierten Bakterien mit 750 µl der eingestellten Zellsuspension an J774A.1 und 85 µl humanem Serum gelangten. Gefäß B) beinhaltete ebenfalls 835 µl an opsonierten Bakterien zusammen mit 750 µl Zellkulturmedium und 85 µl humanem Serum. A) und B) wurden nachfolgend für 30 min bei 37°C und 400 Upm inkubiert. Ansätze B) dienten zur Berechnung der Anfangs-KBE und KBE nach den entsprechenden Koinfektionsintervallen.

Nach den erwähnten Zeitspannen wurden aus A) und B) jeweils 500 µl Probevolumen entnommen und mit dem gleichen Volumen an PBS (4°C) gemischt, gefolgt von einem Zentrifugationsschritt bei 200 x g. Aus B), wo nach Zentrifugation durch das Fehlen von eukaryotischen Zellen kein Pellet hervorging, wurden anschließend 100 µl für eine serielle Verdünnungsreihe zur Bestimmung von $KBE_{t=30'}$ entnommen. A) beinhaltete nach dem Zentrifugieren extrazelluläre Bakterien in den Überständen und J774A.1 mit aufgenommenen *S. pyogenes*-Zellen im Zellpellet. Die Überstände wurden in ein neues Reaktionsgefäß übertragen und Pellets weitere zweimal mit PBS (4°C) gewaschen. Während des Waschens wurden die jeweiligen Überstände vereinigt. Zur Ermittlung der extrazellulären KBE erfolgte Zentrifugation bei 3345 x g für fünf min, Pellet-Aufnahme in einem ml PBS und Ausplattierung.

Intrazelluläre Bakterien wurden durch osmotische Lyse von J774A.1-Zellen mit 980 µl PBS (4°C) und 20 µl Saponin (25 mg/ml) gewonnen. Anschließend erfolgte die Ausplattierung zur Bestimmung des Anteils intrazellulärer KBE.

Alle Waschschritte und die Resuspension der bakteriellen Zellpellets zur KBE-Bestimmung erfolgten mit sterilem 1 x PBS. Verdünnungsreihen wurden auf THY-Agar ausplattiert und die Platten anschließend für 16-20 Stunden bei 37°C/5 % CO₂ bebrütet.

Die Anteile internalisierter, extrazellulärer und abgetöteter Zellen wurden wie folgt berechnet:

$$\ddot{U} = \frac{KBE_{\ddot{U}}}{KBE_{t=30'}} * 100\%$$

\ddot{U} = Anteil GAS Überstand [%]
 $KBE_{\ddot{U}}$ = KBE extrazellulärer GAS
 $KBE_{t=30'}$ = KBE ohne J774A.1 nach 30 min

$$I = \frac{KBE_I}{KBE_{t=30'}} * 100\%$$

I = Anteil internalisierter GAS [%]
 KBE_I = KBE internalisierter GAS

$$d\Sigma\ddot{U}+I = 100 \% - [\ddot{U}+I]$$

$d\Sigma\ddot{U}+I$ = Differenz aus Gesamtmenge GAS-Zellen und Summe der Anteile im Überstand und internalisierter GAS

2.9.6. Adhäsions-/Invasionseffizienz von *S. pyogenes* an/in HaCaT-Keratinocyten

Alle Zentrifugationsschritte wurden bei 3345 x g für fünf min durchgeführt. Zum Waschen der über-Nacht-Kulturen, des eukaryotischen Zellrasens sowie zur Aufnahme der bakteriellen Zellpellets und für serielle Verdünnungsreihen wurde ausschließlich steriles 1 x PBS verwendet. Anschließend erfolgte die Ausplattierung der Verdünnungsreihen auf THY-Agar und Bebrütung bei 37°C/5 % CO₂ für 16-20 Stunden.

24 Stunden vor Versuchsbeginn wurden im 24-Well-Format 1 ml einer HaCaT-Zellsuspension ($3,5 \cdot 10^5$ Zellen/ml) ausgesät. Für den Wildtyp M49, *Spy49_1658c* und zur Berechnung der Zelldichte des HaCaT-Zellrasens wurden jeweils drei Wells vorbereitet. GAS über-Nacht-Kulturen wurden mit PBS gewaschen und auf eine OD_{600nm} = 0,05 in DMEM+GlutaMAX™ eingestellt. Serielle Verdünnung und Ausplattierung der *S.pyogenes*-Kulturen dienten zur Bestimmung der Ausgangs-KBE und der Multiplizität der Infektion (MOI). Parallel wurde der HaCaT-Monolayer mit 1 x PBS gewaschen. Je Well wurde 1 ml der eingestellten Bakteriensuspension zugegeben. In den Wells zur Bestimmung der Zelldichte des Monolayers erfolgte nach Entfernung des Medienüberstandes und Waschen des Monolayers eine 10-minütige Behandlung mit 0,25 % Trypsin-EDTA zum Ablösen adhärenter Zellen. Um das Wachstum der bakteriellen Zellen im Zellkulturmedium zu berücksichtigen, wurde jeweils ein weiteres Well pro Stamm ohne HaCaT-Monolayer mit 1 ml der eingestellten GAS-Zellsuspension befüllt. Die Koinfektionsplatten inkubierten für zwei Stunden bei 37°C/5% CO₂.

Zur Bestimmung des Anteils internalisierter GAS-Zellen wurden die Medienüberstände entfernt, die Wells mit 1 x PBS gewaschen und je Well 1 ml DMEM/10% hiFKS mit 1 % Penicillin-Streptomycin (5000 U und 5000 µg pro ml; Invitrogen; v/v) zur Abtötung aller extrazellulären Bakterien zugegeben. Danach erfolgte ein weiterer Inkubationsschritt bei 37°C/5% CO₂ für zwei Stunden. Nach der Penicillin-Streptomycin Behandlung erfolgte die Ermittlung des Anteils internalisierter KBE. Dafür wurde, ähnlich wie zur Bestimmung der Menge an adhärenenten GAS-Zellen, das Medium entfernt, Wells zweimal gewaschen und der Monolayer durch eine 10-minütige Behandlung mit Trypsin-EDTA (0,25%) aufgelöst. Die HaCaT-Zellsuspensionen wurden in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und die Welloberfläche zweimal gespült. Spülfraktion und HaCaT-Zellsuspension wurden vereinigt. Nach Zentrifugation und Aufnahme des Pellets in einem ml A. bidest erfolgte serielle Verdünnung und Ausplattierung dieser zur Ermittlung internalisierter KBE.

Wells, welche ausschließlich GAS-Zellen (ohne HaCaT-Monolayer) enthielten, dienten zur Bestimmung der $KBE_{t=2}$ für die zweistündige HaCaT-*S.pyogenes*-Koinfektion. Dabei wurde wie folgt vorgegangen: Entnahme der Bakteriensuspension, Anlegen serieller Verdünnungsreihen und Ausplattierung.

Zur Ermittlung des Anteils adhärenenter und im Überstand befindlicher GAS-Zellen wurden die Überstände entfernt und von jeweils drei Wells gepoolt. Anschließend wurde der HaCaT-Zellrasen zweimal mit PBS gewaschen, wobei die Waschfraktionen mit den Medienüberständen vereinigt wurden. Nach Zentrifugation und Resuspension des Pellets in einem ml PBS, erfolgte die Ermittlung der KBE der Überstandsfraktionen durch serielle Verdünnung und Ausplattierung. Durch Zugabe von 0,25 % Trypsin-EDTA und einer 10-minütigen Inkubation bei 37°C wurde der HaCaT-Monolayer abgelöst und nachfolgend in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Auch hier wurden jeweils drei Wells vereinigt. Im Anschluss wurden die Wells zweimal mit PBS gewaschen und die Waschfraktionen mit der entsprechenden HaCaT-Zellsuspension gepoolt. Zum Schluss wurden alle Proben zentrifugiert und zur osmotischen Zelllyse in einem ml sterilen A. bidest. aufgenommen. Serielle Verdünnung und Ausplattierung folgten zur Berechnung des Anteils adhärenenter GAS-Zellen.

Zur Berechnung der prozentualen Anteile an internalisierten und im Überstand befindlichen GAS-Zellen wurden die Formeln aus Abschnitt 2.9.5. verwendet. Der Anteil internalisierter Zellen bezog sich dabei auf die Gesamtmenge an Bakterien nach Koinkubation und entsprach somit I_{Gesamt} . Zusätzlich wurde auch der Anteil internalisierter *S. pyogenes* an der Menge adhärenenter GAS-Zellen berechnet: $I_A = (KBE_I/KBE_A) \cdot 100\%$

Der Anteil adhärenter GAS-Zellen sowie die Differenz zwischen der Summe der Anteile nicht-adhärenter, adhärenter und internalisierter *S. pyogenes*-Zellen zur GAS-Gesamtmenge wurden wie folgt berücksichtigt:

$$A = \frac{KBE_A}{KBE_{t=2}} * 100\%$$

A = Anteil adhärenter GAS [%]
 KBE_A = KBE adhärenter GAS
 $KBE_{t=2}$ = KBE nach 2h-Koinfektion

$$d\S \ddot{U} + A + I_{Gesamt} = 100\% - [\ddot{U} + A + I_{Gesamt}]$$

$d\S \ddot{U} + A + I_{Gesamt}$ = Differenz der Summe aus nicht-adhären, adhären und internalisierten GAS zur GAS-Gesamtmenge [%]
 \ddot{U} ; I = Anteil GAS Überstand [%] bzw. Anteil internalisierter GAS [%];
 Berechnung siehe Abschnitt 2.9.5.

2.9.7. Bestimmung der Überlebensraten in Vollblut

Blutproben wurden am Versuchstag frisch von jeweils drei unterschiedlichen Spendern entnommen und die berechneten Multiplikationsfaktoren anschließend gemittelt.

Um das Überleben in Vollblut zu bestimmen wurde folgende Methode nach Nakata *et al* (2009) verwendet: Über-Nacht-Kulturen von M49 WT und $\Delta Spy49_1658c$ wurden mit frischem THY-Medium 1:20 verdünnt und bis zur mittleren exponentiellen Wachstumsphase angezogen. Danach wurde die optische Dichte bei 600 nm auf 0,25 eingestellt und die Proben anschließend 1:10.000 mit 1 x PBS verdünnt. In einem Gesamtvolumen von 500 μ l wurden die Zellsuspensionen 1:25 mit frischem Vollblut verdünnt und für weitere drei Stunden bei 37°C und 400 Upm (Eppendorf Thermomixer® compact) inkubiert. Zur Ermittlung der Ausgangs-KBE wurden Aliqots der 1:10.000 Verdünnung auf Columbia-Agarplatten mit 5 % Schafsblut aufgetragen. Nach drei-stündiger Koinkubation mit Vollblut wurde durch serielle Verdünnung und Ausplattierung auf Blutagarplatten die KBE ermittelt. Zur Berechnung des Multiplikationsfaktors wurde die KBE nach drei-stündiger Inkubation in Vollblut ins Verhältnis zur Ausgangs-KBE gesetzt.

2.10. In-Silico Analysen von Spy49_1658c und Spy49_1659c

2.10.1. Sequenzvergleiche sowie Identifikation potentieller Motive

Zur Vorhersage möglicher Funktionen von *Spy49_1658c/Spy49_1659c* wurden sowohl Nukleotid- als auch Aminosäuresequenzen auf eventuelle Homologien, Ähnlichkeiten und potentielle Motivstrukturen untersucht. Dabei wurde der BLAST Algorithmus folgender Datenbanken zur Hilfe genommen:

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- <http://www.kegg.com/>

Eine *in-silico* Strukturanalyse der Genprodukte von *Spy49_1658c* und *Spy49_1659c* wurde am Faculty of Science der University of Auckland durchgeführt.

2.10.2. Identifizierung potentielle Promotor- und Terminatorstrukturen

Ein Bereich von ca. 100 bp stromaufwärts des Startcodons von *Spy49_1659c* und die intergenische Region zwischen *Spy49_1658c* und *Spy49_1659c* wurde mit Hilfe folgender Internetseite: <http://linux1.softberry.com/>, auf mögliche Promotoren untersucht. Dabei diente der BPPROM Algorithmus zur Identifikation eines potentiellen bakteriellen Promotors.

Um mögliche Terminatoren innerhalb der intergenischen Region und ca. 120 nt stromabwärts von *Spy49_1658c* zu lokalisieren, wurde folgende Internetseite zur Hilfe genommen: <http://mfold.rna.albany.edu/?q=mfold>. Durch Anwendung des von M. Zuker (2003) entwickelten Algorithmus zur Vorhersage von Sekundärstrukturen in Nukleinsäuresequenzen wurde die DNA-Sequenz nach potentiellen Terminatoren untersucht. Zur Berechnung der freien Energie und Enthalpie diente die Veröffentlichung von J. Jr. SantaLucia (1998).

2.11. Statistische Auswertung

Zur Berechnung signifikanter Unterschiede zwischen den Mittelwerten zweier Stichproben (WT und Mutante) eines Experimentes wurde ein Zweistichproben-t-Test durchgeführt. Dabei wurde Normalverteilung und gleiche Varianz der Stichproben vorausgesetzt.

3. Ergebnisse

3.1. Charakterisierung von Transposonsystem *TnSpc*

Das Transposonsystem *TnSpc* wurde zur Generierung von Mutantenbanken in den Serotypen M18 und M49 von *S. pyogenes* verwendet. Um unbekannte virulenzassoziierte Gene in *S. pyogenes* zu identifizieren, sollte jedes annotierte Gen durch die Insertion von *TnSpc* deaktiviert werden. Das verwendete Transposonsystem sollte deshalb zwei wichtige Eigenschaften besitzen:

- 1) hohe Transformationseffizienz, um schnell eine hohe Anzahl an Insertionsmutanten generieren zu können
- 2) geringe Insertionsfrequenz, da pro Insertionsmutante jeweils nur ein Gen durch den Einbau inaktiviert werden sollte.

Die Transformationseffizienz wurde durch Bestimmung der Anzahl gewonnener Insertionsmutanten pro μg eingesetzter Plasmidmenge pMGC57-spc für beide Serotypen berechnet. Aus mindestens drei unabhängigen Elektroporationsexperimenten ergab sich für M18 eine mittlere Integrationseffizienz von $190 (\pm 102) \text{ KBE}/\mu\text{g}$ Plasmid-DNA und für Serotyp M49 eine Effizienz von $370 (\pm 128) \text{ KBE}/\mu\text{g}$ Plasmid-DNA. Bezogen auf die eingesetzte Menge an kompetenten *S. pyogenes* Zellen, ergab sich für M18 eine mittlere prozentuale Transformationseffizienz von $24 \cdot 10^{-5} (\pm 21 \cdot 10^{-5}) \%_{\text{KBE}/\mu\text{g}}$ Plasmid-DNA und für M49 $7 \cdot 10^{-5} (\pm 6 \cdot 10^{-5}) \%_{\text{KBE}/\mu\text{g}}$ Plasmid-DNA. Trotz der im Vergleich zu Serotyp M18 erhöhten Anzahl an M49 *TnSpc*-Insertionsmutanten, war die prozentuale Ausbeute an M18-Insertionsmutanten um das Dreifache erhöht im Vergleich zu Serotyp M49.

Mittels Southern-Blot (Material und Methoden 2.8.) mit einer generierten *aad9*-spezifischen Sonde ließ sich die Anzahl integrierter Transposonelemente bei einer zufälligen Auswahl von jeweils 20 M18 und M49 *TnSpc*-Insertionsmutanten visualisieren und somit die Insertionsfrequenz darstellen. Dabei zeigte sich, dass in Serotyp M18 bevorzugt nur ein Transposonelement integriert wurde. Die Verteilung der relativen Größen der detektierten DNA-Fragmente ließ auf einen zufälligen Einbau ins Genom von M18 schließen, da lediglich bei drei von 20 untersuchten *TnSpc*-Mutanten *aad9*-Signale in der selben Größenordnung detektiert wurden.

Im Fall von Serotyp M49 wurde bei 7 Mutanten mehr als ein Transposonelement im Genom detektiert. Aufgrund der Größenverteilung der detektierten *aad9*-Signale konnte man auch bei Serotyp M49 von einer zufälligen Insertion ausgehen.

Exemplarisch wurden in Abb. 3 Anzahl und Verteilung detektierter *aad9*-Signale für eine Auswahl von jeweils acht Tn*Spc*-Mutanten in beiden Serotypen dargestellt.

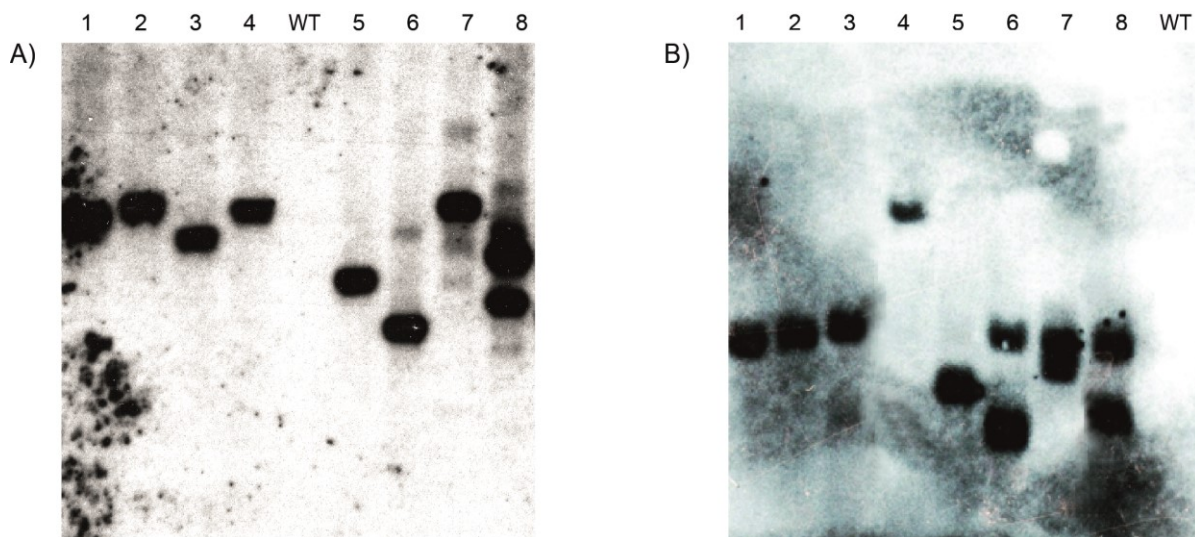


Abb. 3: Southern-Blot Analysen zufällig ausgewählter Tn*Spc* Insertionsmutanten.

A) des Serotyps M18 und B) des Serotyps M49. Als Sonde diente ein Digoxigenin-markiertes Fragment der Spektinomycinresistenzkassette aus pMGC57-spc.

3.2. Generierung von Mutantenbanken und Selektion virulenzrelevanter Mutanten

3.2.1. Aufbau von Tn*Spc*-Mutantenbanken in *S. pyogenes* M18 und M49

Aufgrund der zufälligen Insertion von Tn*Spc* in das Genom von Serotyp M18 und M49 und der hohen Ausbeuten an Mutanten, wurde Tn*Spc* zur Generierung umfassender Mutantenbanken in *S. pyogenes* herangezogen. Um mit einer hohen Wahrscheinlichkeit jedes Gen durch die Integration des Transposons zu inaktiviert, sollte die Anzahl generierter Insertionsmutanten mindestens das Dreifache der Gesamtzahl annotierter Gene für Serotyp M18 und M49 betragen.

Insgesamt wurden in Serotyp M18 7427 Insertionsmutanten erzeugt, was bei 1925 annotierten Genen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) einer Genomabdeckung von $\sim 3,9$ entsprach. Für Serotyp M49 wurden insgesamt 6700 Insertionsmutanten generiert. Da das Genom von M49 Stamm 591 noch nicht vollständig sequenziert ist, wurde stets NZ131 als Referenzstamm für *S. pyogenes* M49 verwendet. Bei 1789 annotierten Genen für NZ131

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) entsprach dies einer Genomabdeckung von $\sim 3,7$ für die M49-Mutantenbank.

3.2.2. Selektion virulenzrelevanter *TnSpc*-Mutanten

Die Selektion virulenz-relevanter Phänotypen erfolgte auf Agarplatten mit subletalen Konzentrationen an H_2O_2 und Menadion zur Erzeugung von oxidativem Stress. Als interne Qualitätskontrolle der generierten Mutantenbanken wurde zusätzlich das Hämolyseverhalten untersucht. In Abb. 4 wurde die Vorgehensweise des Selektionsverfahrens veranschaulicht.

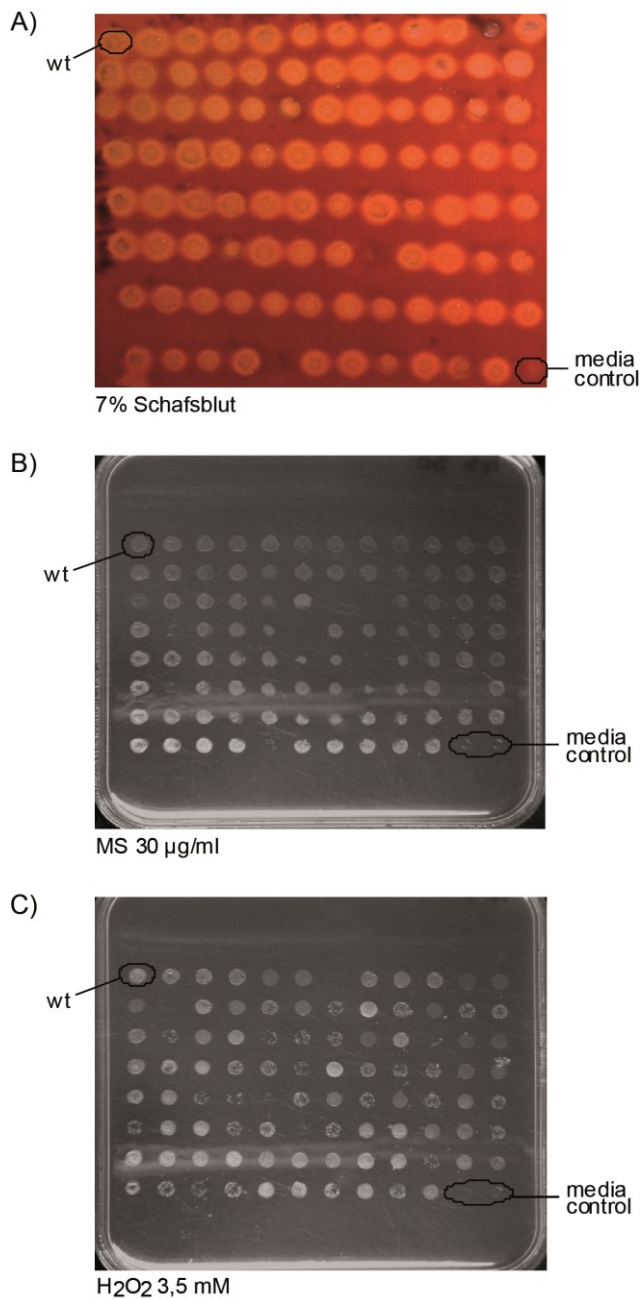


Abb. 4: Exemplarische Darstellung von M49 *TnSpc*-Mutanten, die von einer 96-Well-Platte auf verschiedene Medien überimpft wurden.

A) Agarplatten mit Schafsblut (7%) zur Untersuchung des Hämolyseverhaltens, B) THY-Agarplatten mit 30 µg/ml MS und C) mit 3,5 mM H₂O₂.

Phänotypisch auffällige Mutanten wurden separiert und das Toleranzverhalten dieser Stämme gegenüber Menadion und H₂O₂ in zwei weiteren Selektionsrunden nochmals untersucht (s. Material und Methoden 2.9.1.). Aus den Ergebnissen der drei Selektionsdurchgänge ergab sich ein in Tab. 8 dargestelltes Gesamtbild.

Tab. 8: Übersicht über die Anzahl an *TnSpc*-Mutanten mit abweichender Toleranz gegenüber MS und H₂O₂ im Vergleich zum WT.

Zusätzlich wurde auch die Anzahl an nicht-hämolisierenden *TnSpc*-Mutanten angegeben.

M18 Mutanten	H ₂ O ₂ sensitiv	MS sensitiv	H ₂ O ₂ /MS sensitiv	γ Hämolyse
Anzahl nach 1. Selektion	2	57	13	8
Anzahl n. Bestätigungsrunden	19	6	11	7
% auf Gesamtanzahl (7427) n. Bestätigungsrunden	0,26	0,08	0,23	0,09
M49 Mutanten	H ₂ O ₂ sensitiv	MS sensitiv	H ₂ O ₂ /MS sensitiv	γ Hämolyse
Anzahl nach 1. Selektion	100	7	5	7
Anzahl n. Bestätigungsrunden	11	20	47	5
% auf Gesamtanzahl (6700) n. Bestätigungsrunden	0,16	0,3	0,7	0,08

In Serotyp M49 zeigten insgesamt mehr Insertionsmutanten eine im Vergleich zum WT erhöhte Sensitivität gegenüber oxidativen Stress als in M18. Insgesamt konnten in Serotyp M49 mehr als das dreifache an Menadion- und H₂O₂/Menadion-sensitive Mutanten selektiert werden als in Serotyp M18. Eine Ausnahme bildete die beobachtete Menge an H₂O₂-sensitiven *TnSpc*-Mutanten, welche bei beiden Serotypen mit 19 M18 und 11 M49 *TnSpc*-Stämmen in der gleichen Größenordnung lag. Beide Beobachtungen spiegelten sich auch in den prozentualen Anteilen der *TnSpc*-Insertionsmutanten mit einer erhöhten Sensitivität gegenüber oxidativen Stress an der Gesamtgröße der jeweiligen Mutantenbank wieder. Da beide Serotypen unterschiedliche Besiedlungsräume im/am menschlichen Organismus bevorzugen und somit auch verschiedene Umweltansprüche besitzen, könnte dies eine Erklärung für die beobachteten Abweichungen sein.

Die Anzahl nicht-hämolisierender *TnSpc*-Mutanten war in beiden Serotypen, mit sieben M18 *TnSpc*- und fünf M49 *TnSpc*-Stämmen, nahezu identisch, was ebenfalls auf die prozentualen Anteile zutraf.

Bei einigen *TnSpc*-Stämmen des Serotyps M18 und M49 wurden Unterschiede zwischen dem Phänotyp aus dem ersten Selektionsdurchgang zum Phänotyp aus den nachfolgenden Bestätigungsrunden beobachtet. Für sechs M18 Mutantenstämme, welche in der ersten Selektionsrunde eine erhöhte Sensitivität gegenüber H₂O₂ und Menadion im Vergleich zum WT aufzeigten, konnte in den Bestätigungsrunden eine erhöhte H₂O₂-Toleranz beobachtet werden. Elf M18 *TnSpc*-Mutanten mit einer höheren Menadion-Sensitivität als der WT im ersten Selektionsdurchgang zeigten in den Bestätigungsrunden zusätzlich eine höhere H₂O₂-

Sensitivität. Wohingegen vier M18 *TnSpc*-Stämme statt der im ersten Selektionsdurchgang festgestellten erhöhten Menadion-Sensitivität in den Wiederholungen eine verminderte Menadion-Sensitivität im Vergleich zum WT zuzuschreiben war. Bei einer *TnSpc*-Mutante wurde in den Bestätigungsrunden neben der geringeren Menadion-Sensitivität auch eine erhöhte H₂O₂-Sensitivität beobachtet. In 15 Fällen der untersuchten M18 *TnSpc*-Mutanten änderte sich der Phänotyp von einer erhöhten Menadion-Sensitivität in der ersten Selektionsrunde zu verstärkt H₂O₂-sensitiv in den Bestätigungsdurchläufen.

Betrachtet man die Ergebnisse der verschiedenen Selektionsdurchgänge für *TnSpc*-Mutanten des Serotyps M49, stellte man folgendes fest: Ein Wandel des Phänotyps von verstärkt H₂O₂-sensitiv im ersten Selektionsdurchgang zu verstärkt Menadion-sensitiv in den Bestätigungsrunden wurde für 14 Stämme beobachtet. In zwei Fällen wurde statt der anfänglich beobachteten erhöhten Menadion-Sensitivität in den Wiederholungsrunden ein Anstieg in der H₂O₂-Sensitivität festgestellt. Weitere zwei Stämme mit einem Menadion-sensitiveren Phänotyp als der WT im ersten Selektionsdurchgang zeigten in den Wiederholungen zusätzlich eine erhöhte H₂O₂-Empfindlichkeit. Hinzu kamen 43 Stämme mit einer zu Beginn detektierten verstärkten H₂O₂-Sensitivität und in den Wiederholungen entdeckten zusätzlich erhöhten Menadion-Sensitivität.

Zusammen mit oxidativem Stress spielen antimikrobielle Peptide (AMP) bei der Bekämpfung bakterieller Eindringlinge in den ersten Schritten der menschlichen Immunabwehr eine wesentliche Rolle. Aufgrund dessen erfolgte in den Bestätigungsrunden zusätzlich eine Untersuchung des Wachstumsverhaltens auf THY-Agarplatten mit ansteigenden Konzentrationen an Colistin (Sulfatsalz) (Col.; s. 2.9.1.). Auch hier wurden Unterschiede zwischen beiden Serotypen deutlich. Für M18 konnten neun Prozent der untersuchten *TnSpc*-Insertionsmutanten mit einer erhöhten Sensitivität und 28 % mit einer verminderten Sensitivität im Vergleich zum WT beobachtet werden. Wohingegen für Serotyp M49 80 % der Mutanten eine erhöhte Empfindlichkeit und ca. drei Prozent eine verminderte Empfindlichkeit im Vergleich zum WT zeigten.

Durch die Verwendung von Menadion und H₂O₂ zur Erzeugung von oxidativen Stress, sowie Colistin als ein Vertreter antimikrobieller Peptide, konnten *TnSpc*-Stämme mit einer vom WT veränderten Sensitivität selektiert werden. Vermutlich wurden durch Transposoninsertion Gene, welche an der Abwehr von oxidativen Stress und/oder AMP beteiligt sind, inaktiviert.

Zur näheren Untersuchung wurde eine Auswahl von *TnSpc*-Stämmen in beiden Serotypen getroffen.

3.2.3. Weiterführende Geno- und Phänotypisierung

Unter allen Transposonmutanten mit einer vom WT abweichenden Empfindlichkeit gegenüber oxidativem Stress u./o. dem antimikrobiellen Peptid Colistin erfolgte eine Auswahl von insgesamt 44 Stämmen. Dabei wurde darauf geachtet, dass der Phänotyp dieser *TnSpc*-Stämme in den Bestätigungsrunden identisch mit dem Phänotyp aus dem ersten Selektionsdurchgang war. Eine nähere Charakterisierung erfolgte zunächst bezüglich der Anzahl integrierter *TnSpc*-Elemente. Zusätzlich wurde für acht nicht-hämolyisierende Insertionsmutanten des Serotyps M18 und für sieben des Serotyps M49 die Anzahl eingebauter *TnSpc*-Elemente ermittelt. Weiterführende Experimente wie das Wachstumsverhalten definierter Zelldichten unter oxidativen Stress und Colistinstress und die Lokalisation des eingebauten *TnSpc*-Elements erfolgten ausschließlich für Stämme mit einer einmaligen Transposoninsertion.

3.2.3.1. Southern-Blot Analyse zur Bestimmung der Anzahl integrierter *TnSpc*-Elemente

Zur Bestimmung der Insertionsfrequenz von *TnSpc* wurden Southern Blot Analysen durchgeführt. Bei einer Auswahl von *TnSpc*-Insertionsmutanten mit einem distinkten Phänotyp diente die Insertionsfrequenz als ein Ausschlusskriterium, da Mutanten mit einer mehrfachen *TnSpc*-Insertion für weitere Experimente nicht in Betracht gezogen wurden.

Von 20 untersuchten M18::*TnSpc* Stämmen mit einer veränderten Sensitivität gegenüber oxidativen Stress u./o. AMP Colistin konnte bei sechs Stämmen eine einmalige Transposoninsertion festgestellt werden. Die restlichen 14 M18::*TnSpc* Stämme waren durch eine mehrfache Insertion des Transposonelements gekennzeichnet. Desweiteren zeigten zwei von acht untersuchten nicht-hämolyisierenden M18 Transposonmutanten eine einmalige *TnSpc*-Insertion. In Abb. 5 unter A) wurde für diese acht M18::*TnSpc* Stämme mit einer einmaligen Insertion von *TnSpc* die Röntgenfilm-Ausschnitte der detektierten Sondensignale zusammengefasst.

Im Fall von Serotyp M49 wurden für insgesamt 24 Insertionsmutanten mit einer vom WT abweichenden Empfindlichkeit gegenüber Menadion u./o. H₂O₂ u./o. Colistin die Anzahl integrierter *TnSpc*-Elemente durch einen Southern-Blot ermittelt. Hier konnte bei 13 Stämmen ein einzelnes Sondensignal detektiert werden. 11 M49::*TnSpc* Stämme zeigten zwei

und mehr integrierte Transposonelemente. Von den sieben untersuchten nicht-hämolysierenden M49::*TnSpc* Stämmen besaßen zwei ein *TnSpc*-Element. Abb. 5 B) zeigt für alle M49::*TnSpc* Stämme mit einer einmaligen Transposoninsertion die Ausschnitte der erhaltenen Röntgenfilme aus den Southern-Blot Analysen.

Im Anhang unter Abschnitt 6.3.1. wurden die Originalbilder der hier gezeigten Röntgenfilmausschnitte nochmals aufgeführt. Für alle *TnSpc*-Stämme mit einer mehrfachen Transposoninsertion sind die Originalröntgenfilme ebenfalls im Anhang unter Abschnitt 6.3.1. zu finden.

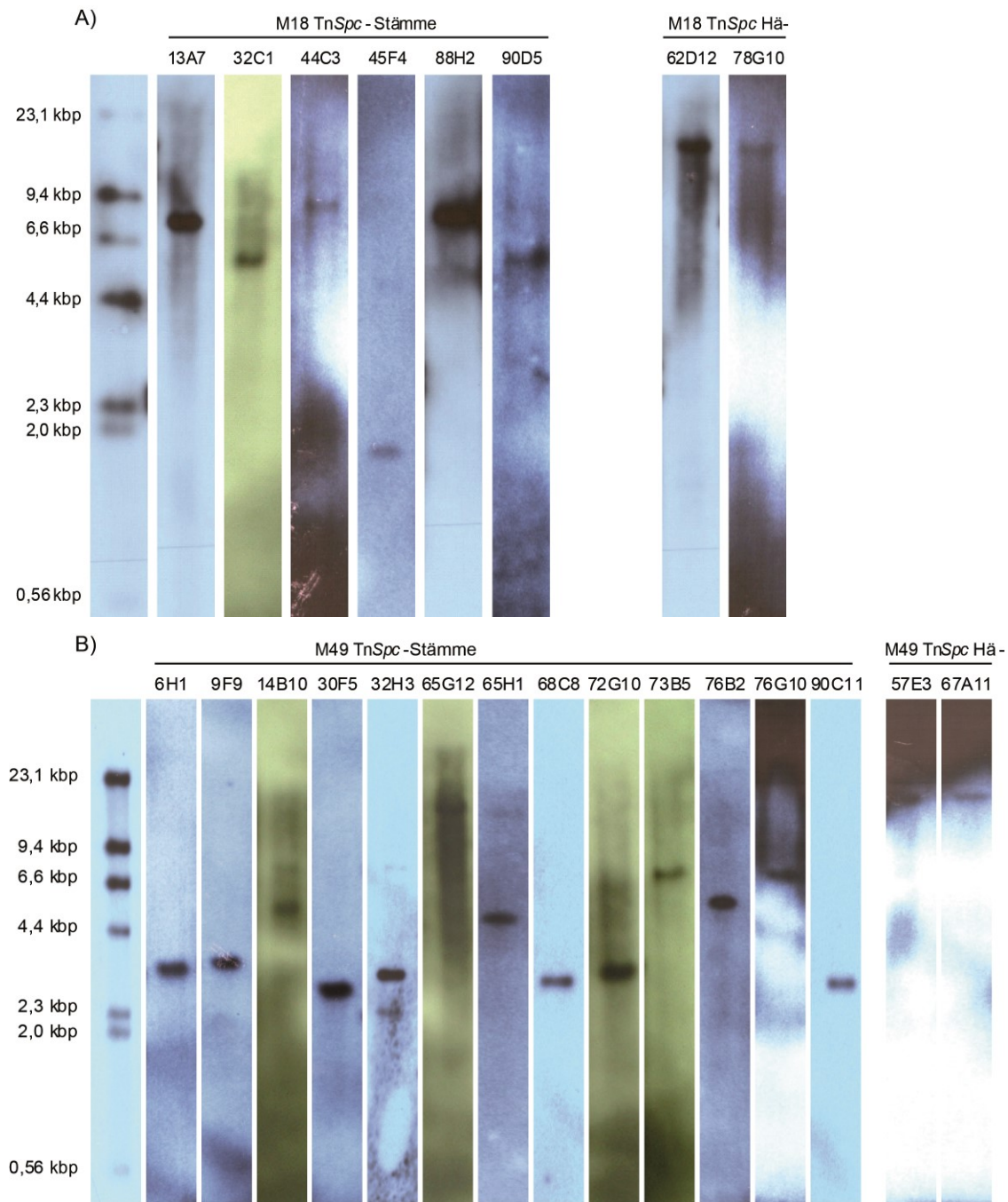


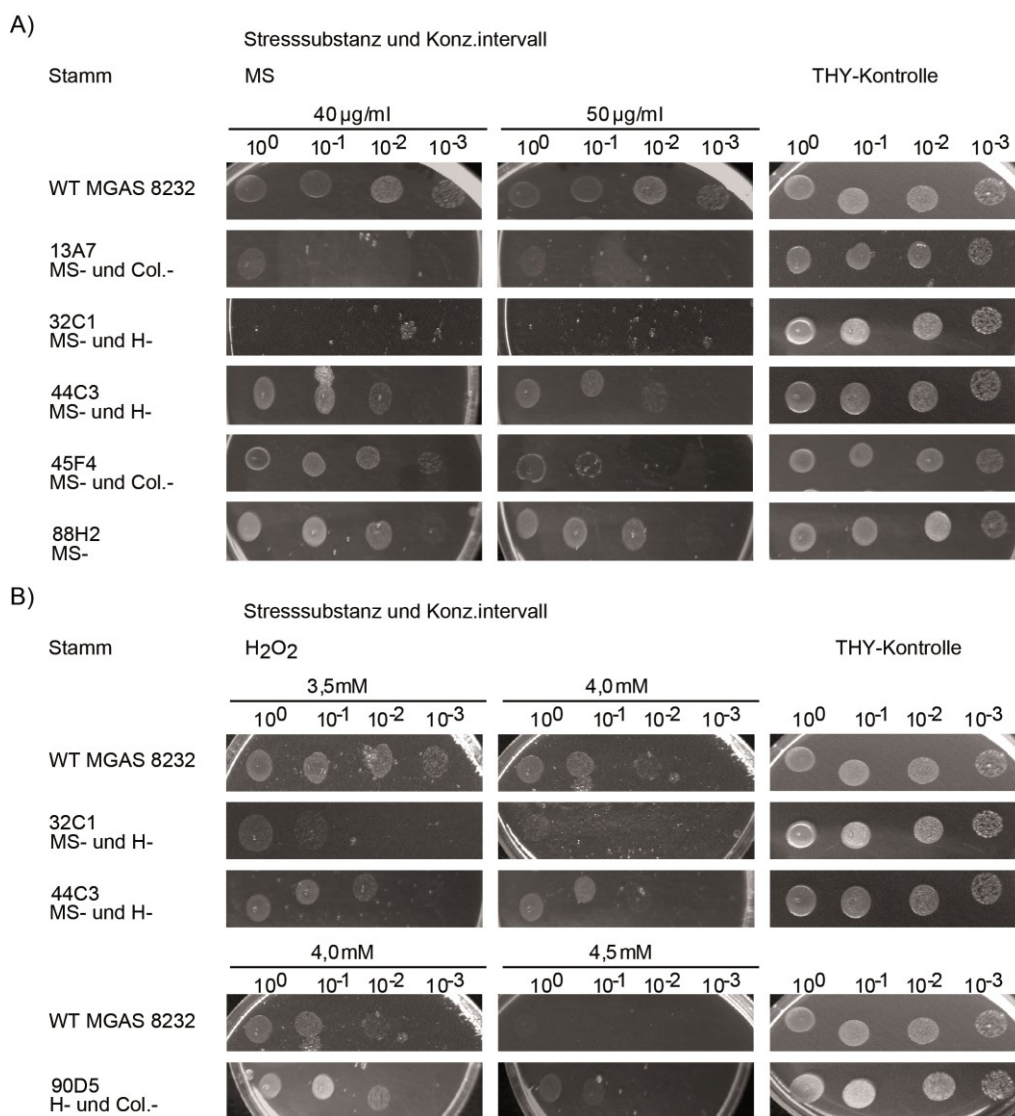
Abb. 5: Southern-Blot der *TnSpc*-Mutanten mit einem *TnSpc*-Element.

A) des Serotyps M18 und B) des Serotyps M49. Als Sonde diente ein Digoxigenin-markiertes Fragment der *aad9*-Kassette aus pMGC57-spc.

Da eine schnelle und eindeutige Zuordnung des beobachteten Phänotyps auf den Genotyp bei *TnSpc*-Stämmen mit einer einmaligen Transposoninsertion vorgenommen werden konnte, erfolgten weiterführende Untersuchungen lediglich mit diesen Stämmen.

3.2.3.2. Verändertes Wachstumsverhalten von *TnSpc*-Stämmen auf unterschiedlichen Stressmedien

M18 und M49 *TnSpc*-Stämme mit einer einmaligen Transposoninsertion wurden hinsichtlich ihres Wachstumsverhaltens auf THY-Agarplatten mit Menadion, H₂O₂ und Colistin nochmals untersucht. Um den Vergleich der erhaltenen Phänotypen zu verbessern, erfolgte der Einsatz definierter Zelldichten stationärer Kulturen. Abb. 6 und Abb. 7 dokumentieren das Wachstumsverhalten der untersuchten M18 und M49 Insertionsmutanten auf den jeweiligen Stressmedien sowie Columbia-Agarplatten mit 5 % Schafsblut für die nicht-hämolysierenden Stämme.



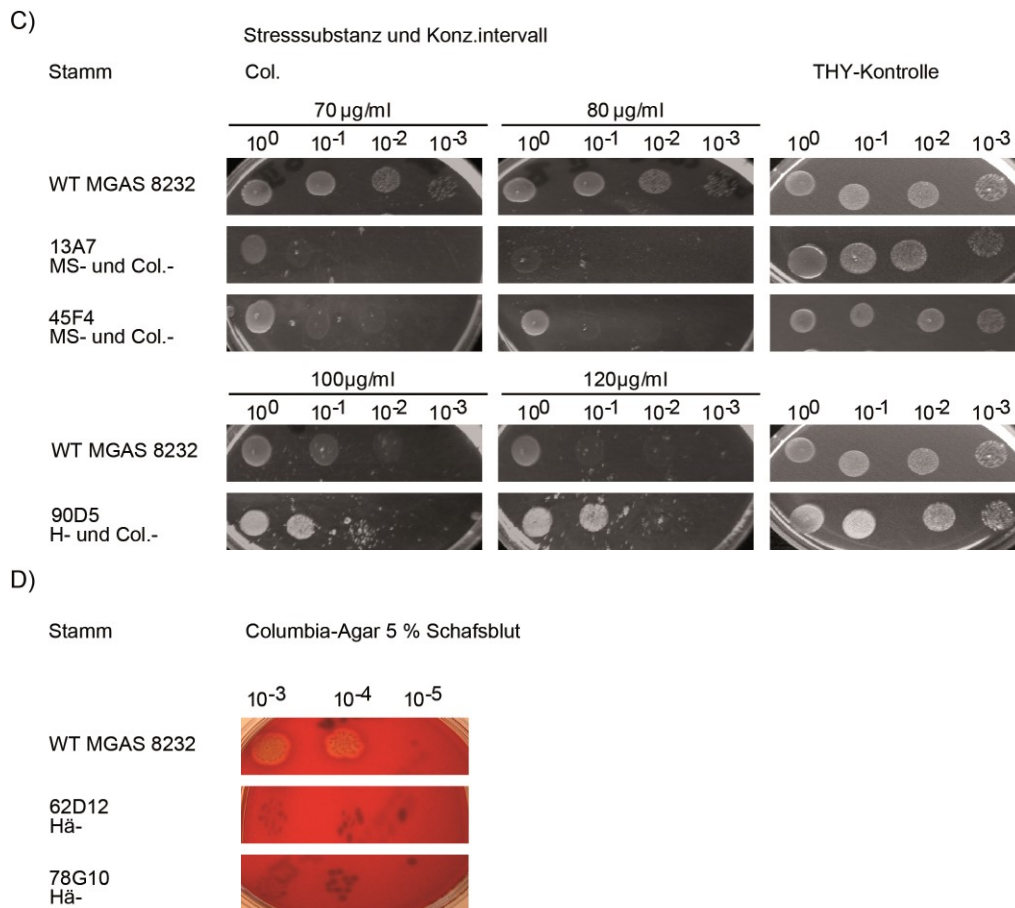


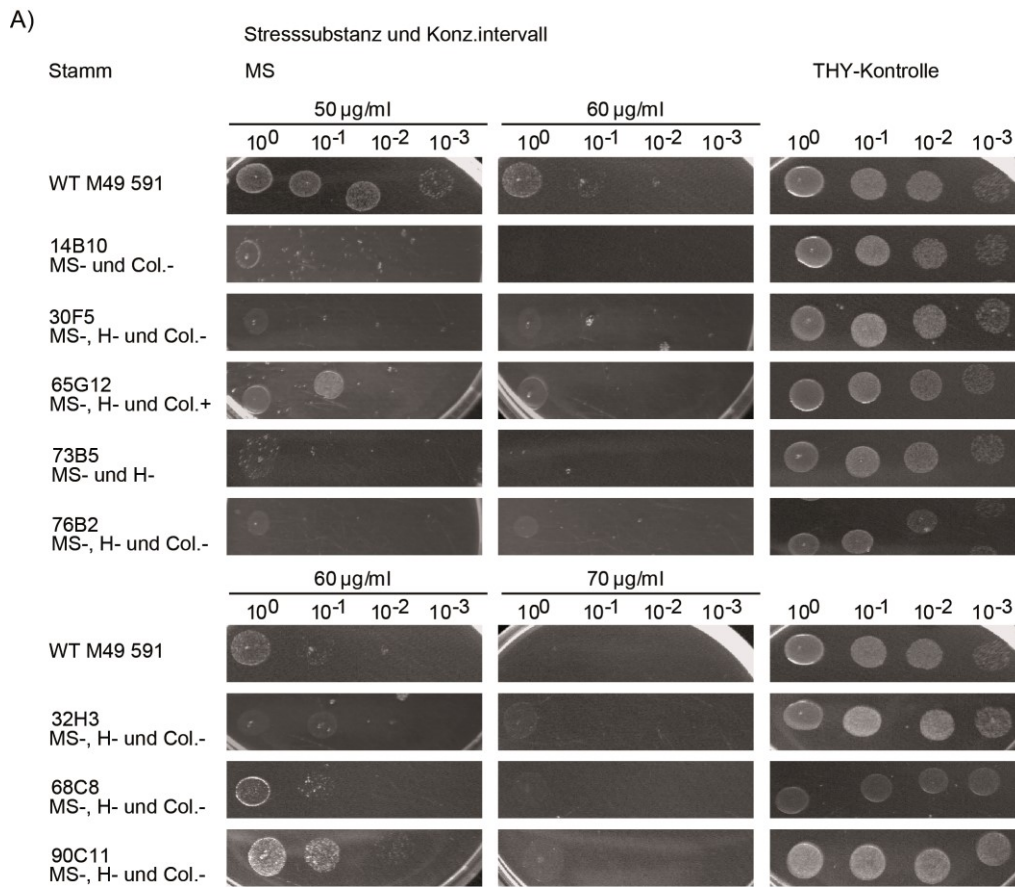
Abb. 6: Wachstumsverhalten von M18 TnSpc-Mutanten auf Stress-Agarplatten.

Agarplatten wurden mit ansteigenden Konz. an MS (A) und H₂O₂ (B) zur Induktion von oxidativem Stress, sowie Col. (C) als Vertreter der Gruppe antimikrobieller Peptide versehen. Jeweils 10 µl einer seriellen Verdünnungsreihe (unverdünnt bis 10⁻³) von über-Nacht Kulturen mit einer definierten Zelldichte von 6*10⁷ (OD_{600nm} ca. 1,0) wurden auf die Stressmedien aufgetragen. Zusätzlich wurde zur Untersuchung des Hämolyseverhaltens Columbia-Agar mit 5 % Schafsblut (D) verwendet. Dafür wurden jeweils fünf µl der Verdünnungsstufen 10⁻³ bis 10⁻⁵ (entsprach 6*10⁴ bis 6*10² KBE/ml) der stationären Kulturen aufgetropft. Alle ausgewählten Mutanten waren durch den einmaligen Einbau des Transposonelements gekennzeichnet. Neben der Stammbezeichnung erfolgte die Angabe der während des Selektionsverfahrens festgestellten Phänotyps. Angaben von + oder – beziehen sich auf eine im Vergleich zum WT erhöhte oder verringerte Toleranz. Als Wachstumskontrolle für die Stressversuche dienten THY-Agarplatten ohne Zusatz.

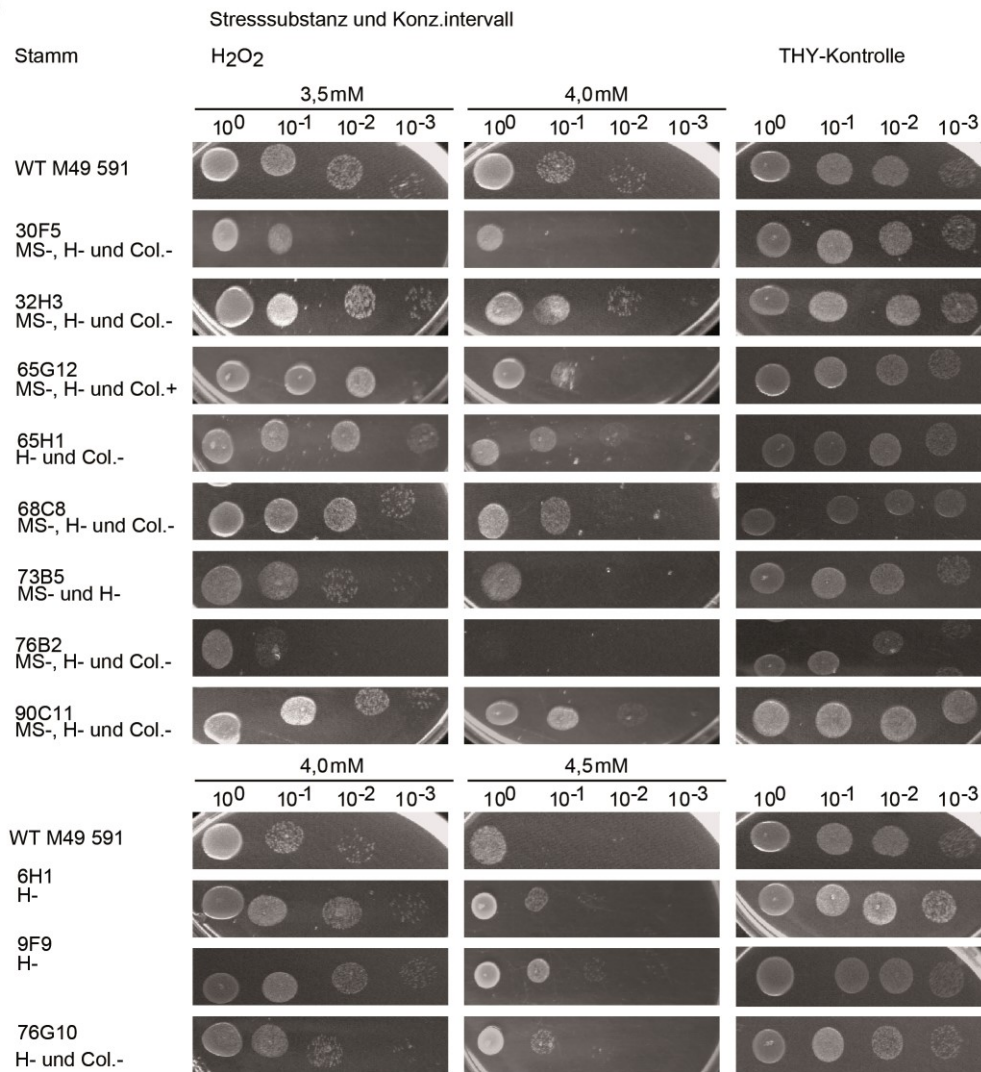
Mit Ausnahme von Stamm 90D5 ließen sich die in den verschiedenen Selektionsdurchgängen im 96-Well-Format beobachteten Phänotypen auch mit definierten Zelldichten von 6*10⁷ bis 6*10⁴ KBE/ml bestätigen. Wie in Abb. 6 unter B) zu erkennen ist, war Stamm 90D5 wesentlich toleranter gegenüber WT-letale Dosen an H₂O₂ von 4,5 mM. Das Wachstum von 6*10⁷ und 6*10⁶ KBE/ml war im Gegensatz zum WT nicht beeinträchtigt. Eine ähnliche Situation zeigte sich auch unter Colistinstress, Abb. 5 C). Bei Konz. von 120 µg/ml Colistin war der WT allein bei einer Zelldichte von 6*10⁷ KBE/ml fähig zu wachsen, wohingegen Stamm 90D5 auch noch bei einer Zelldichte von 6*10⁶ KBE/ml überlebensfähig war.

Für die nicht-hämolysierenden M18 *TnSpc*-Stämme 62D12 und 78G10 konnte auch mit eingestellten Zelldichten von $6 \cdot 10^4$ bis $6 \cdot 10^2$ KBE/ml keine Auflösung der Erythrozyten und Hämoglobinabbau beobachtet werden.

Abb. 7 zeigt das Wachstumsverhalten definierter Zelldichten an M49::*TnSpc* Stämmen mit einem integrierten Transposonelement auf Agarplatten mit ansteigenden Konz. an oxidativen Substanzen Menadion und H_2O_2 sowie dem AMP Colistin.



B)



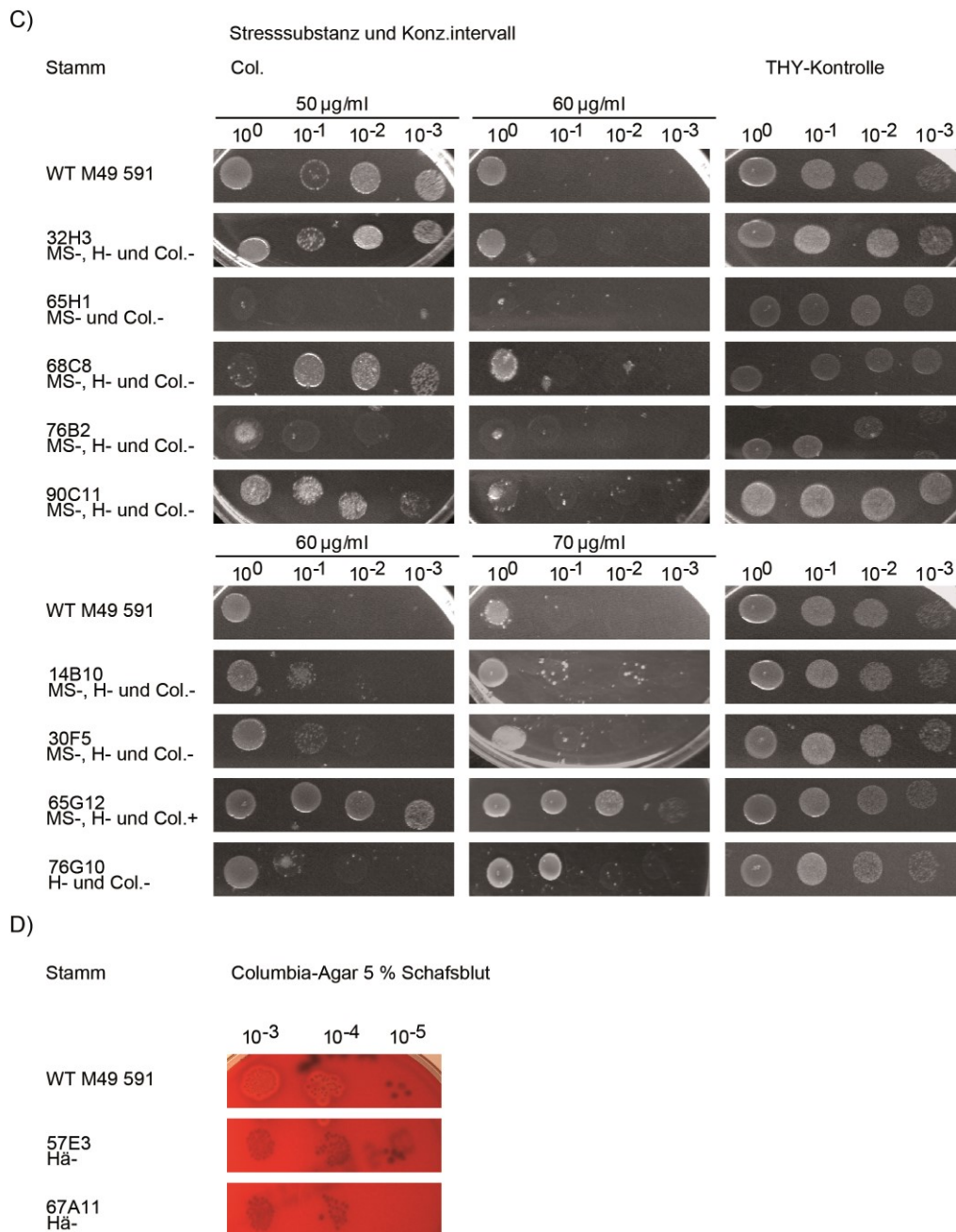


Abb. 7: Wachstumsverhalten von M49 *TnSpc*-Mutanten auf Stress-Agarplatten.

M49 *TnSpc*-Mutanten mit einem integrierten Transposonelement wurden verwendet. Wachstumsversuche erfolgten auf Festmedien mit den oxidativen Substanzen MS (A) und H₂O₂ (B) sowie Colistin (C) als ein Vertreter antimikrobieller Peptide. Jeweils 10 µl einer Verdünnungsreihe von 10⁰ bis 10⁻³ von stationären Kulturen mit einer definierten Zelldichte von 10⁸ (OD_{600nm} ca. 1,0) wurden hierfür auf die Stressmedien aufgetragen. Zur Untersuchung des Hämolyseverhaltens (D) wurden Columbia-Blutagarplatten eingesetzt. Jeweils fünf µl einer Verdünnungsreihe von 10⁻³ bis 10⁻⁵ (10⁵ bis 10³ KBE/ml) an über-Nacht Kulturen mit OD_{600nm} = 1,0 wurden dafür auf die Platten aufgetropft. Neben der Stammbezeichnung erfolgte auch Angabe des im Selektionsverfahren beobachteten Phänotyps. Dabei steht + bzw. – für ein zum WT verstärktes bzw. verringertes Toleranzverhalten. Zur Kontrolle des Wachstumsverhaltens wurden THY-Agarplatten ohne Zusätze verwendet.

Bei den Versuchen zum Wachstumsverhalten unter oxidativem oder Colistin-Stress zeigten sich bei einigen Stämmen Unterschiede zwischen dem in den Selektionsdurchgängen beobachteten Phänotyp und dem Toleranzverhalten definierter Zelldichten.

Unter Menadion-Stress, Abb. 7 A), traf dies auf die Stämme 32H3, 68C8 und 90C11 zu. In den Bestätigungsexperimenten zur Phänotypanalyse der M49 *TnSpc*-Mutantenbank wurde eine im Vergleich zum WT verstärkte Empfindlichkeit beobachtet. Dagegen konnte in Versuchen mit definierten Zelldichten eine verringerte Sensitivität gegenüber WT-letaler Menadion-Konz. festgestellt werden (siehe 60 bzw. 70 µg/ml). Bei den *TnSpc*-Mutanten 14B10, 30F5, 65G12, 73B5 und 76B2 zeigte sich dagegen auch mit festgelegten Zelldichten eine erhöhte Sensitivität.

In Wachstumsversuchen auf Agarplatten mit H₂O₂, Abb. 7 B), konnte für die Stämme 6H1, 9F9 und 76G10 ein Anstieg der Toleranz im Vergleich zum WT registriert und damit der Phänotyp aus dem Selektionsverfahren (H-) widerlegt werden. Für 6H1 und 9F9 betrug der Unterschied zwischen WT und *TnSpc*-Mutante bis zu zwei 10er Verdünnungsstufen (Abb. 7 B) 4,5 mM). Bei den Insertionsmutanten 32H3, 65H1, 68C8 und 90C11 wurden keine vom WT abweichenden H₂O₂-Sensitivitäten bemerkt. Für folgende Stämme wurde der Phänotyp aus dem Selektionsverfahren in Bezug auf die verringerte H₂O₂-Toleranz bestätigt: 30F5, 65G12, 73B5 und 76B2.

Betrachtet man das Wachstumsverhalten definierter Zelldichten der *TnSpc*-Stämme 14B10, 30F5 und 76G10 auf Colistinhaltigen THY-Agar (Abb. 7 C), so ließ sich ein Anstieg der Toleranz im Vergleich zum WT feststellen. Der in dem Selektionsverfahren beobachtete Phänotyp (Col.-) wurde ins Gegenteil umgekehrt. Desweiteren konnten für die Stämme 32H3, 68C8 und 90C11 WT-ähnliche Colistintoleranzen dokumentiert werden. Lediglich für 65G12, 65H1 und 76B2 wurde der in den Selektionsexperimenten beobachtete Phänotyp auch mit definierten Zelldichten erzielt.

Für die untersuchten nicht-hämolysierenden Stämme 57E3 und 67A11 bestätigte sich auch in Experimenten mit Zelldichten von 10⁵ bis 10³ KBE/ml der Phänotyp.

Mit definierten Zelldichten konnte für die Mehrheit der untersuchten M18 *TnSpc*-Stämme der Phänotyp aus den Selektionsrunden bestätigt werden. Für den Serotyp M49 zeigten sich bei fast allen Transposonmutanten Abweichungen zwischen dem Phänotyp aus dem Selektionsverfahren und dem Phänotyp definierter Zelldichten. Alle γ -hämolysierenden Insertionsmutanten waren auch mit festgelegten Zelldichten nicht zur Hämolysen fähig. In

Tabelle 9 wurden zur besseren Übersicht die beobachteten Phänotypen aus den Selektionsexperimenten dem Phänotyp definierter Zelldichten gegenübergestellt.

Tab. 9: Gegenüberstellung der beobachteten Phänotypen ausgewählter M18::*TnSpc* und M49::*TnSpc* Stämme.

Beobachtete Phänotypen aus dem Selektionsverfahren und unter Verwendung definierter Zelldichten wurden gegenübergestellt.

M18

Stamm-Nr.	Phänotyp Selektionsverfahren	Phänotyp definierter Zelldichten
13A7	MS- und Col.-	MS- und Col.-
32C1	MS- und H-	MS- und H-
44C3	MS- und H-	MS- und H-
45F4	MS- und Col.-	MS- und Col.-
88H2	MS-	MS-
90D5	H- und Col.-	H+ und Col.+
62D12	Hä-	Hä-
78G10	Hä-	Hä-

M49

Stamm-Nr.	Phänotyp Selektionsverfahren	Phänotyp definierter Zelldichten
6H1	H-	H+
9F9	H-	H+
14B10	MS- und Col.-	MS- und Col.+
30F5	MS-, H- und Col.-	MS-; H- und Col.+
32H3	MS-, H- und Col.-	MS+
65G12	MS-, H- und Col.+	MS-; H- und Col.+
65H1	H- und Col.-	Col.-
68C8	MS-, H- und Col.-	MS+
73B5	MS- und H-	MS- und H-
76B2	MS-, H- und Col.-	MS-; H- und Col.-
76G10	H- und Col.-	H+ und Col.+
90C11	MS-, H- und Col.-	MS+
57E3	Hä-	Hä-
67A11	Hä-	Hä-

3.2.3.3. Lokalisation von *TnSpc*-Insertionsstellen ausgewählter M18::*TnSpc* und M49::*TnSpc* Stämme

Zur Ermittlung der Position des integrierten Transposonelements wurde genomische DNA mit Hilfe des DNeasy Blood and Tissue Kit von Qiagen (s. 2.6.1.2.) isoliert und für eine „SiteFinding“ oder Dye Terminator PCR (s. 2.7.) eingesetzt. Sequenzdaten wurden zur Identifizierung der *TnSpc*-Insertionsstelle durch einen BLAST Alignment (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) für Serotyp M18 mit der Genomsequenz von MGAS8232 und für Serotyp M49 mit NZ131 verglichen. Die erhaltenen Ergebnisse wurden in Tab. 10 zusammen mit Informationen zur identifizierten Genomposition und dem Phänotyp aus Wachstumsexperimenten mit festgelegten Zelldichten eingefügt.

Tab. 10: Zusammenfassung der beobachteten Phänotypen definierter Zelldichten, Position sowie Genbeschreibung der Transposoninsertionsstelle.

Phäno- und Genotyp der ausgewählten Tn*Spc*-Stämme. Transposoninsertionsstelle wurde Fett hervorgehoben. Bezeichnungen wie + bzw. – beziehen sich auf ein erhöhtes bzw. reduziertes Toleranzverhalten gegenüber der jeweiligen eingesetzten Substanz H₂O₂ (H), MS und Col. im Vergleich zum WT. Nicht-hämolisierende Stämme wurden mit Hä- gekennzeichnet.

M18		
Stamm-Nr.	Phänotyp	Position der Tn <i>Spc</i> Insertionsstelle
13A7	MS- und Col.-	401095; <i>spyM18_0494</i> (MtsA Metallbindeprotein eines ABC-Transporters)
32C1	MS- und H-	54687; <i>spyM18_0039</i> (RuvB „Holliday junction“ DNA-Helikase)
44C3	MS- und H-	299440; <i>spyM18_0345</i> (hypoth. Phagenprotein)
45F4	MS- und Col.-	1742540; 47 Bp stromaufwärts <i>spyM18_2077</i> (Mga Regulatorprotein)
88H2	MS-	1555349; <i>spyM18_1876</i> (ManA Mannose-6-Phosphat-Isomerase)
90D5	H+ und Col.+	431219; 596 Bp stromabwärts <i>spyM18_0540</i> (hypoth. Protein ident. mit Signalpeptid SilCR) und 263 Bp stromaufwärts <i>spyM18_0542</i> (N-terminales Fragment v. BlpB)
62D12	Hä-	639225; <i>spyM18_0800</i> (SagB)
78G10	Hä-	638826; <i>spyM18_0800</i> (SagB)
M49		
Stamm-Nr.	Phänotyp	Position der Tn <i>Spc</i> Insertionsstelle
6H1	H+	1630048; <i>Spy49_1651</i> (hypoth. Protein unbekannter Fkt.)
9F9	H+	1630125; 77 Bp stromaufwärts <i>Spy49_1651</i>
14B10	MS- und Col.+	1776856; 145 Bp stromaufwärts <i>Spy49_1787c</i> (konserviertes hypoth. Protein unbekannter Fkt.)
30F5	MS-; H- und Col.+	1799498; 151 Bp stromabwärts <i>Spy49_1808</i> (UDP-Glukose-Pyrophosphorylase) und 157 Bp stromaufwärts <i>Spy49_1809</i> (hypoth. Protein mit RNA-Bindedomäne)
32H3	MS+	1636149; <i>Spy49_1658c</i> (hypoth. Protein unbekannter Fkt.)
65G12	MS-; H- und Col.+	905205; 251 Bp stromabwärts <i>Spy49_0907</i> (Lactoylglutathionylase) und 398 Bp stromaufwärts <i>Spy49_0908</i> (hypoth. Protein)
65H1	Col.-	813344; 40 Bp stromaufwärts <i>Spy49_0814c</i> (UDP-N-acetylmuramyltripeptid-Synthetase) und 62 Bp stromaufwärts <i>Spy49_0815</i> (konserviertes hypoth. Protein)
68C8	MS+	1636196; <i>Spy49_1658c</i> (hypoth. Protein unbekannter Fkt.)
73B5	MS- und H-	1630183; 19 Bp stromaufwärts <i>Spy49_1651</i> (hypoth. Protein mit unbekannter Fkt.)
76B2	MS-; H- und Col.-	34113; <i>Spy49_0017</i> (RecO DNA repair protein)
76G10	H+ und Col.+	641653; <i>Spy49_0638c</i> (FolC.2 Dihydrofolatsynthase /Folypolyglutamatsynthase)
90C11	MS+	1636319; <i>Spy49_1658c</i> (hypoth. Protein unbekannter Fkt.)
57E3	Hä-	570827; <i>Spy49_0569</i> (SagB)
67A11	Hä-	570408; <i>Spy49_0569</i> (SagB)

Auffällig für Serotyp M49 war die Identifizierung von drei *TnSpc*-Stämmen (32H3, 68C8 und 90C11) mit einer Transposoninsertion im Genlocus: *Spy49_1658c*. Alle drei Insertionsmutanten zeigten in den Selektionsdurchgängen und später im Wachstumsversuch mit festgelegten Zelldichten ein identisches Toleranzverhalten auf Menadion-, H₂O₂- oder Colistinhaltenen THY-Agarplatten. Der in den Selektionsverfahren beobachtete Phänotyp, MS-/H₂O₂-/Col.-, wurde durch Wachstumsversuche mit Zelldichten von 10⁸ bis 10⁵ KBE/ml in MS+ korrigiert.

Aufgrund des gehäuften Auftretens der *TnSpc*-Insertionsstelle und der Reproduzierbarkeit des beobachteten Phänotyps für die Stämme 32H3, 68C8 und 90C11, wurden weitere Untersuchungen zur Funktionsanalyse von *Spy49_1658c* unternommen.

3.3. Bestätigung des Genotyps der *Spy49_1658c*::*TnSpc* Mutanten 32H3, 68C8 und 90C11

Die Insertion von *TnSpc* in den Stämmen 32H3, 68C8 und 90C11 wurde auf DNA-Ebene durch PCR unter Verwendung genspezifischer Primer für *Spy49_1658c* und *Spy49_1659c* nachgewiesen (Abb. 8). Im WT ließ sich mit beiden Primerpaaren ein ca. 300 bp langes Fragment vervielfältigen. Für die *TnSpc*-Mutanten war aufgrund der Transposoninsertion innerhalb des kodierenden Bereiches von *Spy49_1658c* das Genfragment um 2450 bp verlängert worden und besaß somit insgesamt eine Länge von ca. 2,8 kbp. Die Länge des amplifizierten Genbereiches von *Spy49_1659c* (ca. 300 bp) war davon nicht beeinträchtigt und entsprach dem des WT.

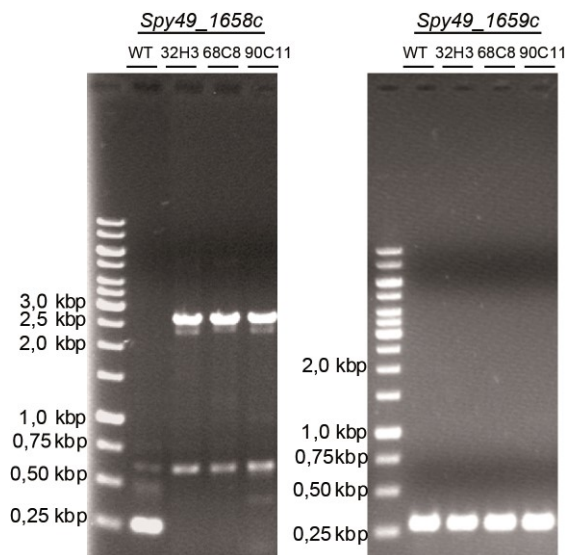


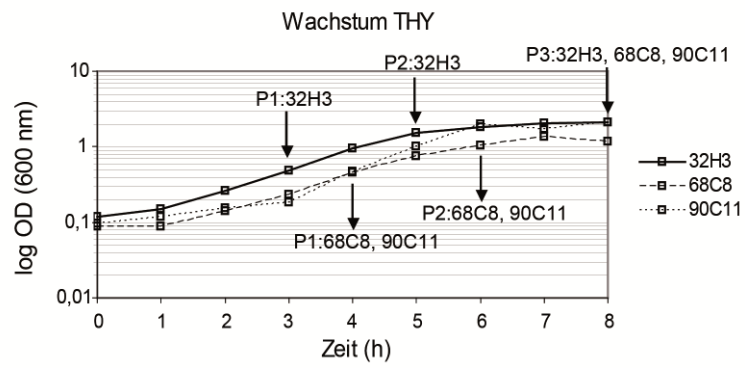
Abb. 8: Elektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte von Ansätzen mit *Spy49_1658c* bzw. *Spy49_1659c*-spezifischen Primern mit gDNA der M49 *TnSpc*-Stämme 32H3, 68C8 und 90C11.

Als Vergleich diente ein Ansatz mit gDNA des WT M49 591. Als Längenstandard wurde ein 1 kbp GeneRuler™ von Fermentas verwendet.

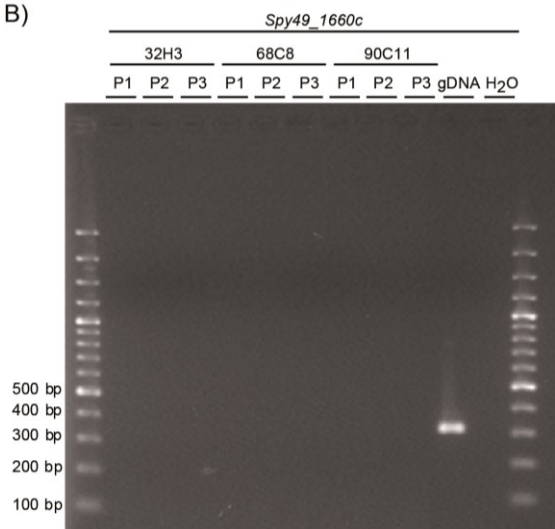
Mit Hilfe einer Northern-Blot-Analyse (2.8.) sollte die Insertion von *TnSpc* in *Spy49_1658c* in den Stämmen 32H3, 68C8 und 90C11 auf Transkriptionsebene nachgewiesen werden (RNA Isolierung 2.6.2.). Da keine Informationen zum Expressionsprofil von *Spy49_1658c* in *S. pyogenes* M49 vorlagen, wurden zur RNA-Gewinnung Zellen aus der exponentiellen, Transitions- und stationären Wachstumsphase herangezogen (s. Abb. 9 A für *Spy49_1658c::TnSpc* und Anhang Abb. 33 A für WT). Zu Beginn wurden unter Verwendung von RNA-Proben des WT M49 591 und Sonden für *Spy49_1658c*, *Spy49_1659c* und 16S-rRNA die optimalen Bedingungen für das Northern-Blot-Verfahren ermittelt. Dabei erhielt man jedoch für *Spy49_1658c* und *Spy49_1659c* keine Sondensignale. Wohingegen mit einer 16S-Sonde Signale detektiert werden konnten (s. Anhang Abb. 34).

Geringe Transkriptmengen für *Spy49_1658c* und *Spy49_1659c*, welche unterhalb der Nachweisgrenze lagen, könnten eine mögliche Ursache hierfür gewesen sein. Aufgrund dessen wurde alternativ eine RT-PCR mit spezifischen Primern für *Spy49_1658c*, *Spy49_1659c* und *Spy49_1657* sowie aus den RNA-Proben P1-P3 synthetisierter cDNA der Insertionsmutanten 32H3, 68C8 und 90C11 durchgeführt (Abb. 9).

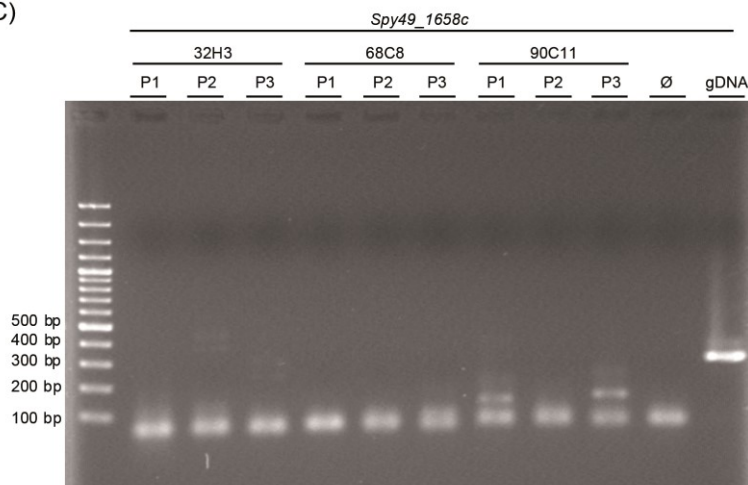
A)



B)



C)



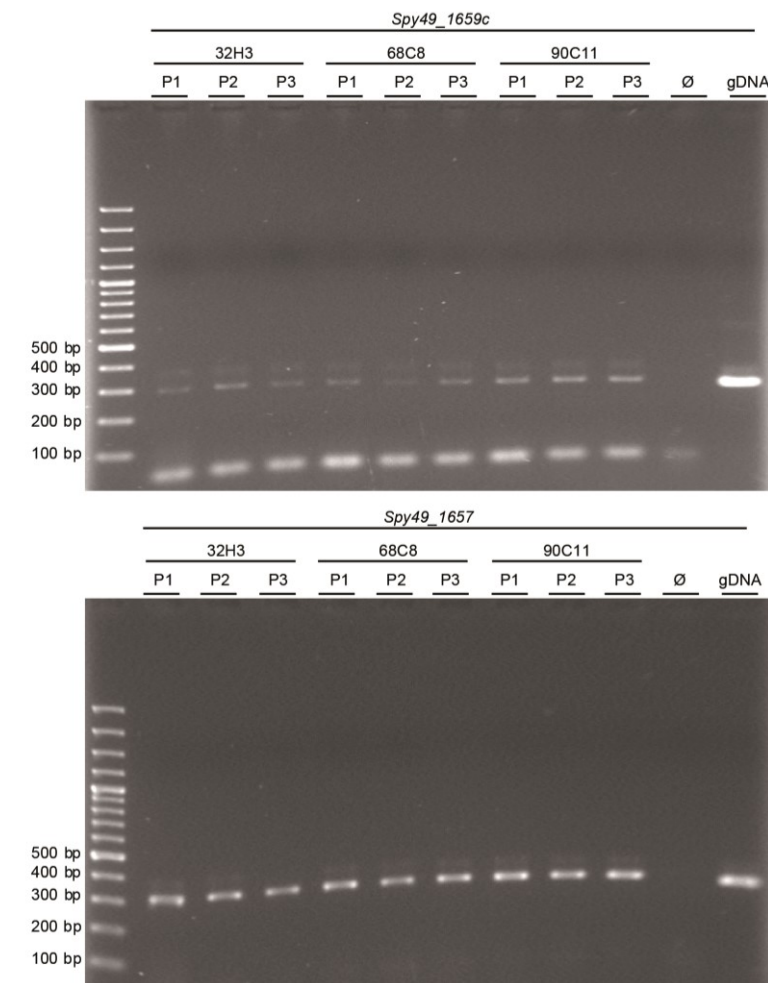


Abb. 9: Nachweis des funktionellen Verlustes von *Spy49_1658c* auf Transkriptionsebene in den Insertionsmutanten 32H3, 68C8 und 90C11.

A) Zur Isolierung von RNA wurden Zellen von Batch-Kulturen aus der exponentiellen, Transitions- und stationären Wachstumsphase (P1-P3) verwendet. B) Gesamt-RNA wurde auf DNA-Verunreinigungen mittels PCR und *Spy49_1660* spezifischen Primern, welche ein 318 bp langes Genfragment amplifizieren, untersucht. C) Auftrennung von Nukleinsäurefragmenten aus RT-PCR-Ansätzen mit cDNA der umgeschriebenen RNA-Proben P1-P3 von 32H3, 68C8 und 90C11. Als Primer wurden *Spy49_1658c*, *Spy49_1659c* bzw. *Spy49_1657* spezifische Oligonukleotide verwendet, welche mit gDNA des WT M49 591 ein 284 bp, 287 bp bzw. 308 bp langes Fragment synthetisierten. B)+C) Als Positivkontrolle diente ein Ansatz mit gDNA des WT M49 591. In den Ø-Ansätzen wurde in der PCR als Template eine Negativ-Kontrolle der cDNA-Synthese, welche anstatt Reverse Transkriptase DEPC-H₂O enthielt, verwendet. Zur Bestimmung der Amplifikatlängen wurde der GeneRuler™ 100 bp DNA Leiter von Fermentas eingesetzt.

Nachdem nachgewiesen wurde, dass in der Gesamt-RNA der Proben P1 bis P3 der Tn*Spc*-Stämme 32H3, 68C8 und 90C11 keine Verunreinigungen durch DNA enthalten waren (Abb. 9 B), erfolgte die reverse Transkription in cDNA. In einer anschließenden PCR mit dem Primerpaar *Spy49_1658c_for/rev* (Abb. 9 C) ließ sich ausschließlich in Gegenwart von gDNA des WT M49 591 ein Amplifikat in der entsprechende Länge von ca. 300 bp generieren. Geringe Mengen unspezifischer PCR-Produkte wurden mit cDNA der Probe P2, bei ca. 400

bp, und P3, ca. 250 bp, von 32H3 beobachtet. Auch unter Verwendung von cDNA der RNA-Proben P1 und P3 des Stammes 90C11 entstanden unspezifische Nebenprodukte in der Größenordnung von ca. 100 bp.

Zusätzlich wurde auch das Vorhandensein von Transkripten der Gene *Spy49_1659c* und *Spy49_1657* in den Tn*SpC*-Stämmen 32H3, 68C8 und 90C11 untersucht. Hier zeigte sich, dass bei allen Insertionsmutanten die Transkription der umliegenden Gene durch den Einbau des Transposonelements nicht beeinträchtigt wurde. Mit Primerpaar *Spy49_1659c_for/rev* und *Spy49_1657_for/rev* (Abb. 9 C) konnten für alle Transposonmutanten in einer RT-PCR Nukleinsäurefragmente in der Größenordnung von ca. 300 bp aufgetrennt werden. Die gDNA des WT M49 591 diente als Positiv-Kontrolle, wobei wie im Fall der *Spy49_1658c* spezifischen RT-PCR für *Spy49_1659c* und *Spy49_1657* DNA-Fragmente von ca. 300 bp Länge synthetisiert werden konnten. Somit konnte durch das Fehlen von *Spy49_1658c*-spezifischen Amplifikaten der Genverlust auch auf Transkriptionsebene nachgewiesen werden.

3.4. In-Silico Analyse von Genregion *Spy49_1658c* bis *Spy49_1659c*

Anhand der Nuklein- und Aminosäuresequenzen erfolgten Untersuchungen bezüglich potentieller Promotor- und Terminatorstrukturen sowie funktioneller Proteindomänen.

3.4.1. Vorhersagen möglicher Promotoren und Terminatoren

Durch Verwendung der Genomdatenbank NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) wurde eine Analyse des Bereiches *Spy49_1657* bis *Spy49_1659c* vorgenommen. Folgende Informationen ließen sich entnehmen:

- Länge des kodierenden Bereiches *Spy49_1658c* = 336 nt
- Annotierte Genfunktion für *Spy49_1658c* = hypothetisches Protein unbekannter Fkt.
- unmittelbar stromaufwärts befindet sich *Spy49_1659c* = hypothetisches Gen mit unbekannter Fkt.
- Länge des kodierenden Bereiches *Spy49_1659c* = 645 nt
- intergenischer Bereich von *Spy49_1658c* und *_1659c* = neun nt
- in 3'-Richtung von *Spy49_1658c* auf komplementären Strang *Spy49_1657* = FlaR DNA-Topologie modulierendes Protein
- Länge des intergenischen Bereichs zw. *Spy49_1657* und *Spy49_1658c* = 124 nt

Aufgrund des kurzen intergenischen Bereiches zw. *Spy49_1658c* und *Spy49_1659c* wurden Untersuchungen zu einer möglichen polycystronischen mRNA-Struktur, bestehend aus beiden Genen, unternommen. Zum einen wurde mit Hilfe des BPROM Algorithmus (<http://linux1.softberry.com/>) ein Abschnitt von ca. 100 nt stromaufwärts *Spy49_1659c* und der intergenische Bereich nach potentiellen Promotoren untersucht. Zum anderen dienten Vorhersagen zu Sekundärstrukturen (mfold) in der Nukleinsäuresequenz der intergenischen Region und stromabwärts von *Spy49_1658c* zum Auffinden von Terminatoren.

In 5'-Richtung von *Spy49_1659c* wurde ein potentieller Promotor („linear discriminant function“ LDF = 8,36; <http://linux1.softberry.com/>) in einer Entfernung von 38 nt vor dem Startcodon „ATG“ vorhergesagt. Für einen *Spy49_1659c/Spy49_1658c* überlappenden Bereich konnte ein weiterer Promotor (LDF = 2,14; <http://linux1.softberry.com/>) prognostiziert werden. Wegen des geringen LDF Wertes wurde dieser Promotor als unwahrscheinlich angesehen. In einem Bereich von ca. 120 nt stromabwärts von *Spy49_1658c* konnte mit Hilfe von „mfold“ die in Abb. 10 A) dargestellte Sekundärstruktur vorausgesagt werden. Der ΔG Wert (Gibbs freie Enthalpie) der unter Standardbedingungen für die Ausbildung dieser Sekundärstruktur notwendig ist, wurde mit -32,32 kcal/mol angegeben. Die Schmelztemp. (T_m) betrug 72,5°C. Zum Vergleich, in dem beide Gene überlappenden Bereich wurden Sekundärstrukturen mit $\Delta G > -8$ kcal/mol und $T_m = 51^\circ\text{C}$ angekündigt. Unter Abb. 10 B) ist die Sekundärstruktur mit dem geringsten ΔG Wert dargestellt.

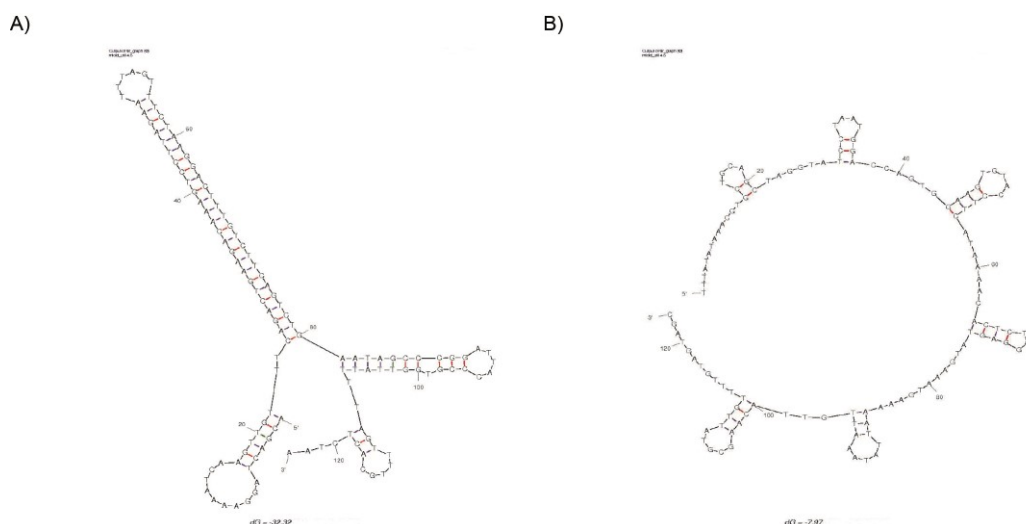


Abb. 10: Prognostizierte Sekundärstrukturen von „mfold“.

A) für einen Bereich von 123 nt stromabwärts *Spy49_1658c* und B) für einen *Spy49_1658c/Spy49_1659c* überlappenden Abschnitt von insgesamt 129 nt Länge. Bedingungen für die Ausbildung der gezeigten Strukturen wurden mit 37°C und 1 M Na⁺ Konz. angegeben. Der ΔG Wert betrug für A) 32,32 kcal/mol und für B) 7,97 kcal/mol.

Die Informationen zur Genregion bestehend aus *Spy49_1657*, *_1658c* und *_1659c* wurden in Abb. 11 zusammengefasst. Zusätzlich wurde die Position des Tn*Sp*c-Elements für die selektierten Mutantenstämme 32H3, 68C8 und 90C11 eingetragen

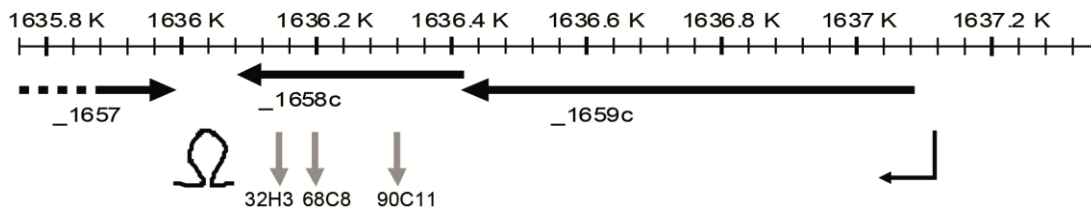


Abb. 11: Schematische Darstellung des Genombereiches von *Spy49_1657* bis *Spy49_1659c*.

Als Grundlage dienten Daten von NCBI für NZ131. Die Position des Tn*Sp*c-Elements der drei Insertionsmutanten wurde als grauer Pfeil angegeben. Die Position eines potentiellen Promotors (↵) stromaufwärts von *Spy49_1659c* und eines Terminator (Ω) stromabwärts von *Spy58_1658c* wurden zusätzlich markiert.

3.4.2. Funktionelle Proteindomänen sowie Struktur von *Spy49_1658c* und *Spy49_1659c*

Die Aminosäuresequenz von *Spy49_1658c* und *Spy49_1659c* wurde im Mai 2010 mit Hilfe der Datenbank KEGG SSDB nach funktionellen Domänen untersucht. Dabei konnte für *Spy49_1658c* ein Motiv für eine Aminosäure-Permease von Position 37 bis 103 (E-Wert = 0,52) sowie eine Isoleucin-reiche Region von Position 39 bis 104 (Smith-Waterman-Bewertung = 54) identifiziert werden. Für *Spy49_1659c* wurde ein Motiv für eine N-Acetyl-Muramoyl-L-Alanin-Amidase von Position 14 bis 66 (E-Wert = 0,024) und eine Domäne unbekannter Funktion von Position 57 bis 85 (E-Wert = 1) entdeckt.

Weiterhin ergab ein Suchdurchlauf nach orthologen Genen für *Spy49_1658c* von März 2011 eine 37 %ige Übereinstimmung mit der Permease *Mfl576* von *Mesoplasma florum* L1.

Eine Strukturanalyse der Proteinsequenz von *Spy49_1658c* identifizierte vier Transmembran-Helices, dadurch ist eine Funktion als Permease sehr wahrscheinlich. Auffällig ist eine Unterbrechung des hydrophoben Transmembranbereiches durch Lysin an Position 59. Genprodukt *Spy49_1659c* zeigte ein N-terminales Signalpeptid sowie eine alpha und beta-Faltung.

3.5. Bestätigung eines polycistronischen Transkriptes von *Spy49_1658c* und *Spy49_1659c*

Der kurze intergenische Bereich zwischen *Spy49_1658c* und *Spy49_1659c* könnte ein polycistronisches Transkript bestehend aus beiden Genen vermuten lassen. Um dies zu untersuchen wurden auf RNA-Ebene mit dem WT M49 591 Experimente zur Expression der betreffenden Gene vorgenommen. Dabei sollte in einer RT-PCR das Vorhandensein von Transkripten der einzelnen Gene und eines beider Gene überlappenden Transkriptfragmentes durch Kombination der Primer *Spy49_1659c_for* und *Spy49_1658c_rev* amplifiziert werden (Abb. 12).

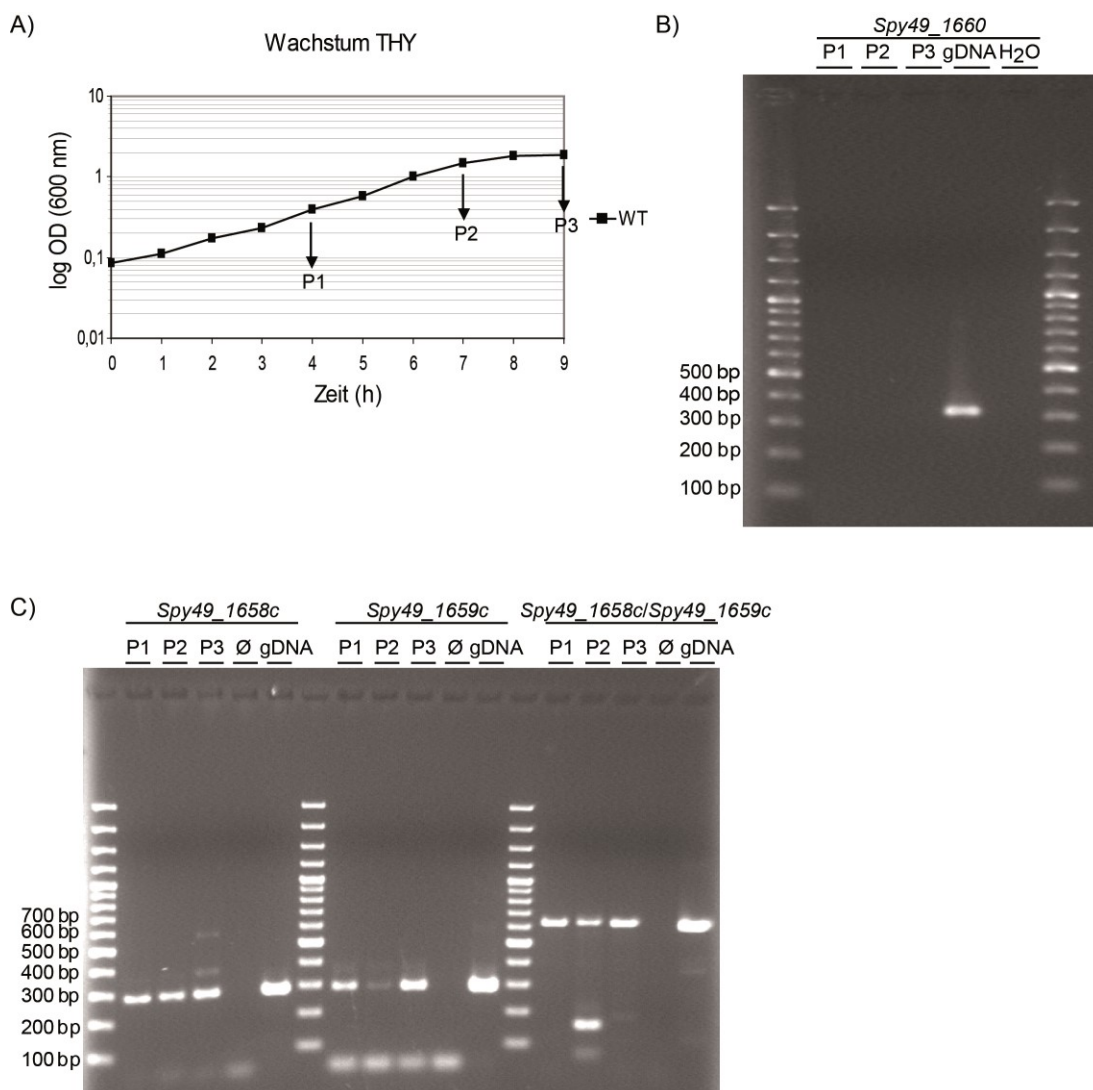


Abb. 12: Untersuchungen zur Bestätigung des polycistronischen Transkriptes bestehend aus *Spy49_1658c* und *Spy49_1659c*.

A) Aus Zellen der exponentiellen, Transitions- und stationären Wachstumsphase (P1-P3) einer Batch-Kultur des WT M49 591 in THY-Medium wurde Gesamt-RNA isoliert. B) Die RNA-Proben P1 bis P3 wurden durch eine PCR mit *Spy49_1660* spezifischen Primern auf DNA-Rückstände untersucht. Als Positiv-Kontrolle diente ein Ansatz mit gDNA des WT M49 591. C) Agarosegel zur Separation von Nukleinsäurefragmenten aus RT-PCR-Ansätzen

mit cDNA der Proben P1-P3. Expression der einzelnen Gene *Spy49_1658c* (284 bp) und *Spy49_1659c* (287 bp) sowie ein beider Gene überlappendes Fragment (653 bp) durch Kombination der Primer *Spy49_1659c_for* und *Spy49_1658c_rev* sollte nachgewiesen werden. B)+C) Als Positiv-Kontrolle dienten Ansätze mit gDNA des WT M49 591. In den Ø-Ansätzen wurde als Template eine Negativ-Kontrolle der cDNA-Synthese, welche anstatt Reverse Transkriptase DEPC-H₂O enthielt, verwendet. Zur Größen-Bestimmung der amplifizierten Nukleinsäurefragmente wurde ein 100 bp GeneRuler™ von Fermentas aufgetragen.

Zellen aus der exponentiellen (P1), Transitions- (P2) und stationären Wachstumsphase (P3) wurden zur RNA-Gewinnung verwendet (Abb. 12 A). Durch das Umschreiben der RNA-Proben P1-P3 in cDNA und einer darauf folgenden PCR konnten mit Primerpaar *Spy49_1658c_for/rev* und *Spy49_1659c_for/rev* ca. 300 bp lange Nukleinsäurefragmente amplifiziert werden (Abb. 12 C), dass entsprach auch den Größen der synthetisierten Genabschnitte auf DNA-Ebene. Transkripte der einzelnen Gene *Spy49_1658c* und *Spy49_1659c* waren demzufolge im WT in allen drei Wachstumsphasen nachweisbar.

Unter Verwendung der Primer *Spy49_1659c_for* und *Spy49_1658c_rev* ließ sich mit gDNA des WT M49 591 ein ca. 650 bp langes DNA-Fragment synthetisieren, was in etwa der vorhergesagten Fragmentlänge entsprach. Ein ca. 650 bp langes Amplifikat erhielt man ebenfalls unter Verwendung der cDNA-Proben P1-P3. Ein zusätzliches PCR-Produkt mit einer Länge von 150 bp wurde mit cDNA aus der Transitionsphase (P2) generiert. Diese Ergebnisse zeigen, dass *Spy49_1658c* und *Spy49_1659c* polycistronisch transkribiert werden. Die Amplifikation einer zusätzlichen 150 bp langen Nukleinsäurebande könnte auf posttranskriptionelle Modifikationen der polycistronischen RNA während der Transitionsphase hindeuten.

3.6. Generierung einer *Spy49_1658c* Deletionsmutante in M49 591

Zur Untersuchung des direkten Einflusses von *Spy49_1658c* auf das Toleranzverhalten unter virulenzrelevanten Stressbedingungen, wie oxidativer Stress und antimikrobielle Peptide, wurde eine gerichtete Deletionsmutante in M49 591 generiert. Als Vektor zur Replikation in *E. coli* DH5α und zur Übertragung in *S. pyogenes* diente pASK-IBA3c (IBA GmbH). Die Deletion erfolgte mittels homologer Rekombination von *Spy49_1658c* flankierenden DNA-Sequenzen (F11 und F12), wobei zw. F11 und F12 eine Resistenzkassette für Spektinomycin (SpR) platziert wurde. Als Kontrolle für das generierte pASK-IBA3c Derivat dienten Restriktionsreaktionen.

Die Amplifikation von SpR wurde mit Hilfe des Primerpaars *aad9_pFW5_Sall_for/aad9_pFW5_NcoI_rev* aus pFW5 durchgeführt und liefert ein 1121 bp langes DNA-Fragment. Zur Vervielfältigung von Fl1, mit einer Gesamtlänge von 890 bp, aus M49 591 diente Primerpaar *Spy49_1658c_Fl1EcoRI_for/ Spy49_1658c_Fl1Sall_rev*. Davon entsprachen 826 bp einem stromabwärts von *Spy49_1658c* gelegenen Genombereich und 43 bp dem 3'-kodierenden Bereich von *Spy49_1658c*. Durch Verwendung von Primerpaar *Spy49_1658c_Fl2NcoI_for/ Spy49_1658c_Fl2HindIII_rev* wurde das insgesamt 571 bp lange Fragment Fl2 aus M49 591 amplifiziert. 38 bp entsprachen dem 5'-kodierenden Bereich von *Spy49_1658c* und 508 bp der unmittelbar stromaufwärts vorkommenden Genregion. Sequenzen zu den angegebenen Primern befinden sich unter Abschnitt 2.6.7. Tabelle 4.

In Abb. 13 sind schematisch die Plasmidkarten des leeren pASK-IBA3c Vektors und seines Derivates pASK-IBA3c-ko*Spy49_1658c* zur gerichteten Deletion von *Spy49_1658c* dargestellt.

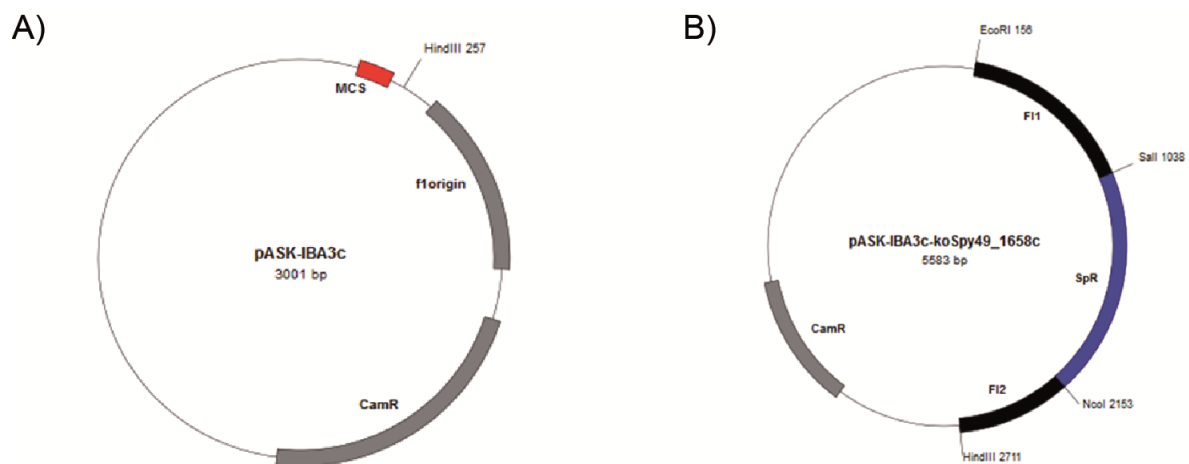


Abb. 13: Plasmidkarten zur Deletion von *Spy49_1658c*.

A) Der leere Vektor pASK-IBA3c (IBA GmbH). „Multiple Cloning Site“ (MCS) als roter Kasten von Bp 139 bis 222. Des Weiteren sind der f1 ori von Bp 337 bis 775 für eine einzelsträngige Replikation und die Chloramphenicol Resistenzkassette CamR von Bp 897 bis 1556 (graue Kästen) zu sehen. B) Plasmidkonstrukt zur Deletion von *Spy49_1658c* in M49 591. Orientierungspunkte wie verwendete Restriktionsschnittstellen der MCS aus pASK-IBA3c zur Insertion der *Spy49_1658c* flankierenden Regionen (schwarze Kästen) und der Spektinomycinkassette SpR (blauer Kasten) wurden angezeigt.

3.6.1. Kontrollverdau von pASK-IBA3c-ko*Spy49_1658c*

In Abb. 14 ist das Ergebnis des Testverdaus von pASK-IBA3c-ko*Spy49_1658c* zu sehen.

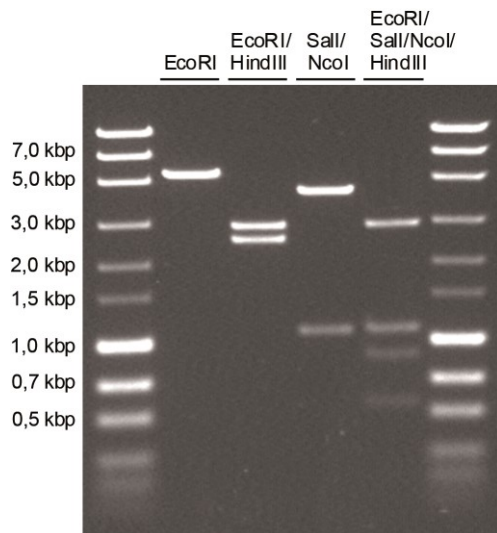


Abb. 14: Kontroll-Verdau von pASK-IBA3c-ko*Spy49_1658c*.

Als Restriktionsenzyme dienten *EcoRI* (Bahn 1), *EcoRI/HindIII* (Bahn 2), *Sall/NcoI* (Bahn 3) und *EcoRI/Sall/NcoI/HindIII* (Bahn 4). Als Längenstandard wurde der MassRuler™ Express Forward DNA Leiter von Fermentas verwendet.

Zusätzlich zum Kontrollverdau erfolgte die Sequenzierung des Konstruktes aus F11+*aad9*+F12 mit Hilfe der Primer *Spy49_1658c_F11EcoRI_for* und *Spy49_1658c_F12HindIII_rev*. Durch den Abgleich der erhaltenen Nukleotidabfolge mit den bekannten Sequenzen aus M49 NZ131 und pFW5 durch Nutzung des BLAST Alignment (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) konnten keine Abweichungen festgestellt werden.

3.6.2. Bestätigung der Deletion von *Spy49_1658c* auf DNA-Ebene

Nach Elektroporation kompetenter M49 Zellen mit pASK-IBA3c-ko*Spy49_1658c* und Selektion auf Spektinomycin-haltigen THY-Agarplatten wurden zwei potentielle Klone überprüft. Zur Bestätigung des Verlustes von *Spy49_1658c* wurden auf DNA-Ebene Kontrollexperimente zur Amplifikation von sowohl WT- als auch Δ *Spy49_1658c* spezifischer Genfragmente durchgeführt (Abb. 15).

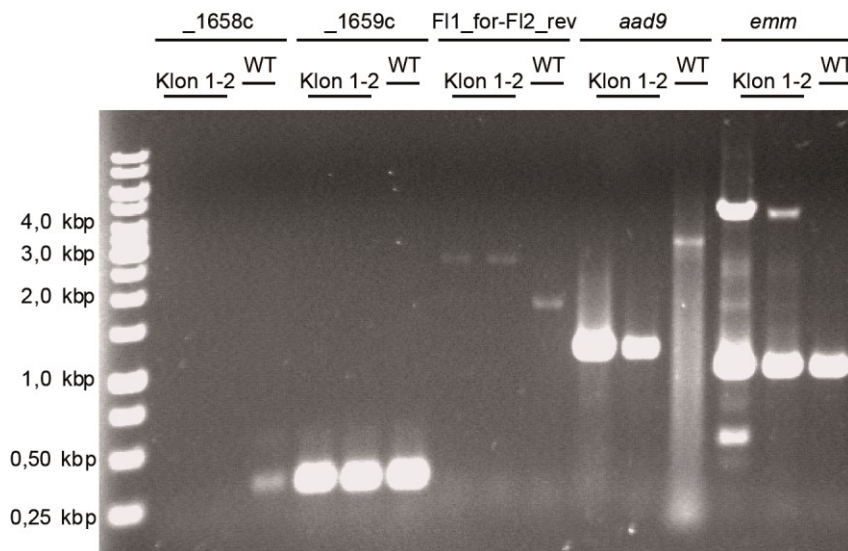


Abb. 15: Auftrennung amplifizierter Genprodukte von zwei potentiellen Δ *Spy49_1658c* Klonen und dem WT zur Bestätigung der gerichteten Deletion durch „double-crossover“.

Bahn 1-3: Primerpaar *Spy49_1658c_for/Spy49_1658c_rev*; Bahn 4-6: Primerpaar *Spy49_1659c_for/Spy49_1659c_rev*; Bahn 7-9: Primerpaar *Spy49_1658c_FL1EcoRI_for/Spy49_1658c_FL2HindIII_rev*; Bahn 10-12: Primerpaar *aad9_pFW5_SalI_for/aad9_pFW5_NcoI_rev*; Bahn 13-15: Primerpaar *emm_1/emm_2*. Als DNA Leiter diente der 1 kbp GeneRuler™ von Fermentas.

Mit *Spy49_1658c*-spezifischen Primern wurde eine 300 bp lange Gensequenz lediglich mit gDNA des WT-Stammes nachgewiesen. Der entsprechende Abschnitt fehlte in den Transformanten. Im Gegensatz dazu konnte ein 300 bp langes Fragment mit *Spy49_1659c*-spezifischen Primern aus gDNA beider Transformanten und des WT amplifiziert werden. Eine PCR mit Primerpaar *Spy49_1658c_FL1EcoRI_for/Spy49_1658c_FL2HindIII_rev* lieferte für beide Klone ein ca. 2,5 kbp und für den WT ein ca. 1,7 kbp langes DNA-Fragment. Aufgrund des Austauschs von *Spy49_1658c* (336 Nukleotiden) gegen *aad9* mit einer Länge von 1114 Nukleotiden entstand ein Größenunterschied von ca. 800 bp zwischen Mutante und WT. Das Vorhandensein von *aad9* konnte für beide Klone nachgewiesen werden, das Fragment besaß die vorhergesagte Länge von ca. 1,2 kbp. Eine PCR mit gDNA des WT führte zu einem unspezifischen Nebenprodukt von ca. 3,5 kbp. Zum Ausschluss von Kontaminationen wurde eine *emm*-Typisierung vorgenommen. Dabei entstand bei beiden potentiellen Δ *Spy49_1658c* Mutanten und dem WT ein ca. 1,0 kbp langes Fragment des *emm*-Gens. Eine anschließende Sequenzierung des 1,0 kbp langen Fragmentes von Klon eins, zwei und des WT ergab eine 100 %ige Übereinstimmung mit *emm49*. Eine Bestätigung des Verlustes von *Spy49_1658c* auf RNA-Ebene sowie weitere Untersuchungen zur Aufklärung der Genfunktion wurden unter Verwendung von Klon zwei der Δ *Spy49_1658c* Mutante durchgeführt.

3.6.3. Bestätigung des Verlustes von *Spy49_1658c* in Δ *Spy49_1658c* auf RNA-Ebene

Nachdem der erfolgreiche Austausch von *Spy49_1658c* gegen die Spektinomycinresistenzkassette bestätigt wurde, erfolgten auf Transkriptionsebene Untersuchungen zum funktionellen Verlust von *Spy49_1658c*. Wie bereits unter 3.3. beschrieben, dienten RNA-Proben aus Zellen der exponentiellen (P1), Transitions- (P2) und stationären (P3) Wachstumsphase zur cDNA-Synthese (Abb. 16 A). Im Anschluss erfolgte eine PCR zur Amplifikation von Sequenzabschnitten der Gene *Spy49_1658c*, *Spy49_1659c* sowie zusätzlich *Spy49_1657* (Abb. 16 C).

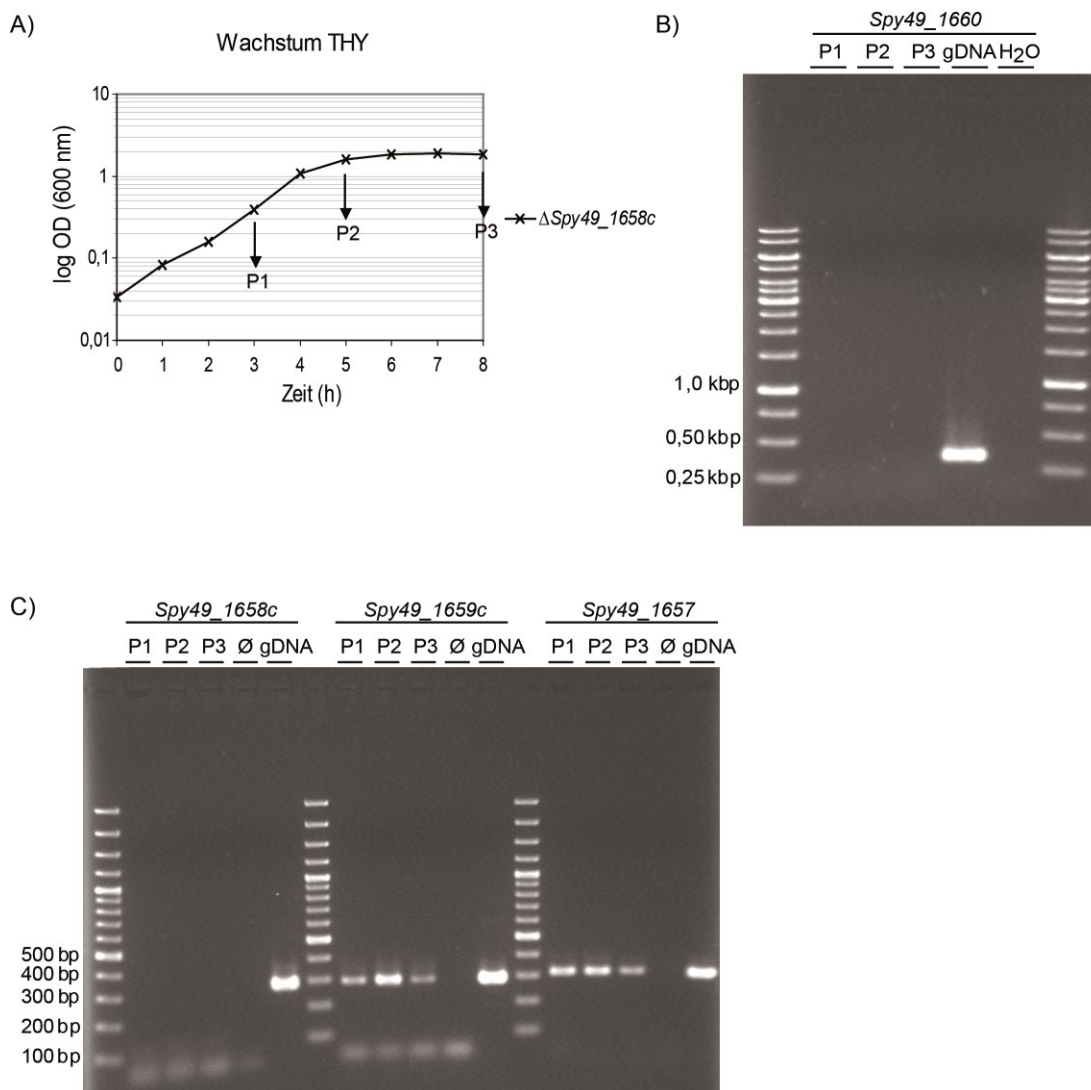


Abb. 16: Kontrolluntersuchungen zur gerichteten Deletion von *Spy49_1658c* in Δ *Spy49_1658c* auf RNA-Ebene.

A) RNA-Isolierung erfolgte aus Zellmaterial der exponentiellen (P1), Transitions- (P2) und der stationären Wachstumsphase (P3). B) Ausschluss von DNA-Kontaminationen in den gewonnen RNA-Proben P1-P3 durch eine PCR mit *Spy49_1660* (318 bp) spezifischen Primern. C) Synthetisierte cDNA aus den RNA-Proben P1-P3 dienten als Grundlage zur Amplifizierung der Genfragmente von *Spy49_1658c* (284 bp), *Spy49_1659c* (287 bp) und

Spy49_1657 (308 bp). Als Positiv-Kontrolle für die eingesetzten PCR-Bedingungen wurde gDNA des WT M49 591 als Template zugefügt.

Abb. 16 B) zeigt, dass in einer *Spy49_1660*-spezifischen PCR ausschließlich mit gDNA des WT ein 300 bp langes DNA-Fragment amplifiziert werden konnte. Somit lagen Verunreinigungen durch DNA unter der Nachweisgrenze in den RNA-Proben P1-P3 von Δ *Spy49_1658c*. In einer anschließenden RT-PCR wurden diese RNA-Proben weiter untersucht (Abb. 16 C). Mit Primerpaar *Spy49_1658c* ließ sich lediglich unter Verwendung von gDNA des WT ein 300 bp langes Fragment amplifizieren. Im Gegensatz dazu erhielt man mit den cDNA-Proben und der gDNA des WT M49 591 für *Spy49_1659c* und *Spy49_1657* 300 bp lange Nukleinsäureabschnitte. Dies bestätigt den Verlust von *Spy49_1658c* auch auf RNA-Ebene.

3.6.4. Erhöhte Toleranz von Δ *Spy49_1658c* auf Stressplatten mit Menadion

Wie unter Abschnitt 3.2.1.2. in Abb. 7 A) bis C) für *Spy49_1658c::TnSpc* Stämme 32H3, 68C8 und 90C11 gezeigt, wurde auch für die generierte Δ *Spy49_1658c* Deletionsmutante das Wachstumsverhalten definierter Zelldichten unter oxidativem und Colistinstress untersucht. Die erhaltenen Ergebnisse sind in Abb. 17 zu sehen.

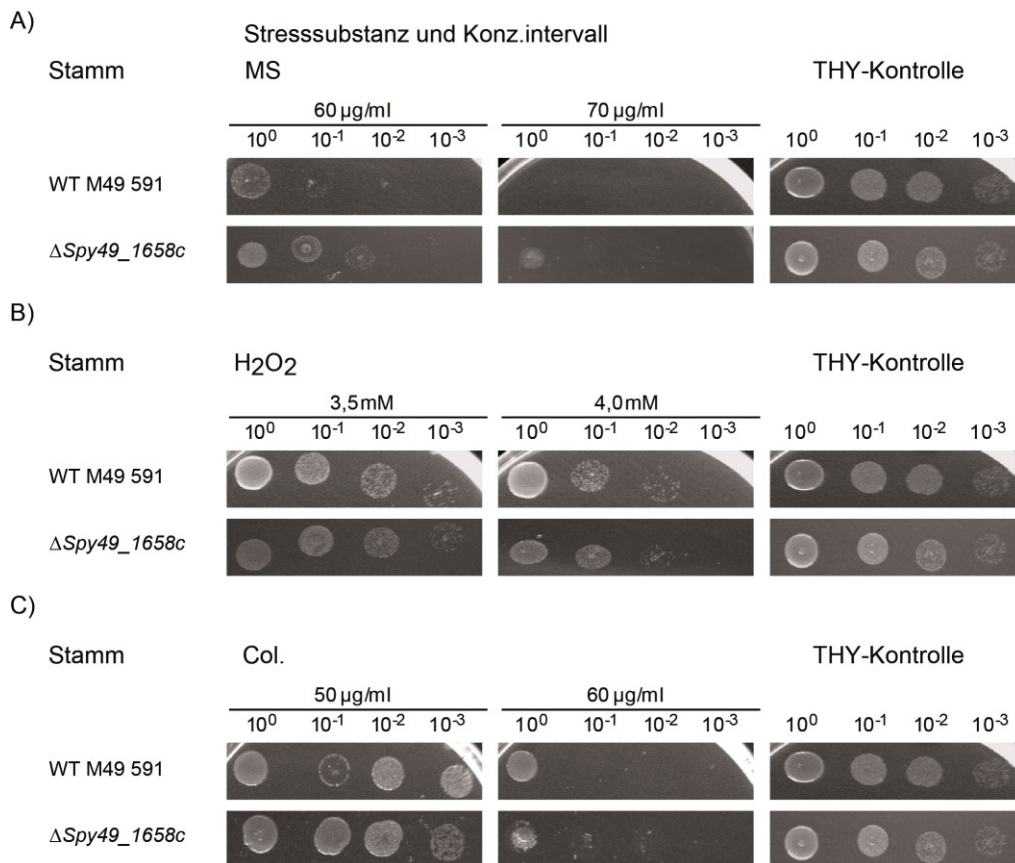


Abb. 17: Wachstumsverhalten von WT M49 591 und ΔSpy49_1658c auf Stress-Agarplatten.

THY-Agarplatten wurden mit ansteigenden Konz. an oxidativen Substanzen MS (A) und H₂O₂ (B) sowie dem antimikrobiellen Peptid Colistin (C) versehen. Jeweils 10 µl einer seriellen Verdünnungsreihe von stationären Kulturen mit einer Zelldichte von 10⁸ KBE/ml (OD_{600nm} ca. 1,0) wurden auf das Festmedium aufgetropft. Nach 24 Stunden erfolgte die Auswertung des Wachstumsverhaltens. Als Kontrolle dienten THY-Platten ohne Zusatz.

Ähnlich wie für die Insertionsmutanten konnte für ΔSpy49_1658c auf THY-Platten mit Menadionkonz. von 60 µg/ml und 70 µg/ml eine im Vergleich zum WT erhöhte Toleranz beobachtet werden (Abb. 17 A). Unter dem Einfluss von 60 µg/ml Menadion waren für ΔSpy49_1658c 10⁸ bis 10⁶ KBE/ml vital, dagegen waren es für den WT nur 10⁸ bis 10⁷ KBE/ml. Auf Agarplatten mit 70 µg/ml Menadion zeigten noch 10⁸ KBE/ml an ΔSpy49_1658c ein Wachstum. Für den WT war diese Konz. bereits letal.

Die Empfindlichkeit gegenüber H₂O₂ und Colistin wurde durch den Verlust von Spy49_1658c nicht beeinträchtigt. Wie unter B) und C) zu erkennen, zeigten WT und Deletionsmutante ein identisches Toleranzverhalten.

Zusammenfassend wurde für stationäre Kulturen an ΔSpy49_1658c lediglich eine erhöhte Toleranz gegenüber WT-letalen Menadionkonz. beobachtet. Dies entsprach auch dem Phänotyp der Spy49_1658c::TnSpc Stämme 32H3, 68C8 und 90C11.

3.7. Physiologische Charakterisierung von *Spy49_1658c*

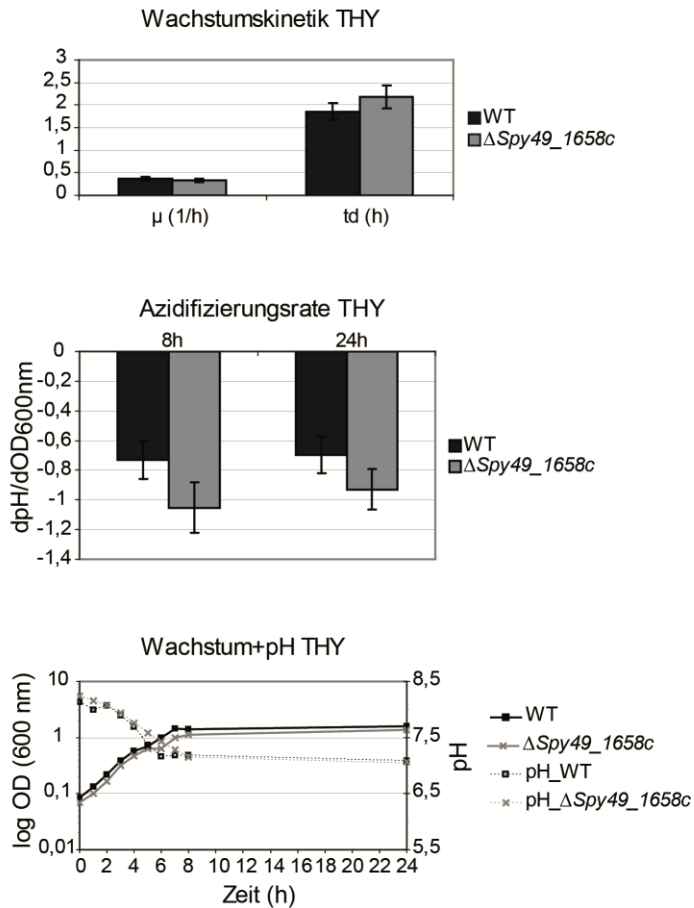
Im 96-Well Format zeigten WT M49 591 und *Spy49_1658c::TnSpc* Stämme 68C8 und 90C11 keine signifikanten Unterschiede im Bezug auf das Wachstumsverhalten in den Medien THY und CDM (s. Anhang 6.3.3. Abb. 35 und Tab. 15, 16). Für *Spy49_1658c::TnSpc* 32H3 wurde jedoch eine signifikant erhöhte μ und dementsprechend auch eine signifikant verringerte td während des exponentiellen Wachstums in THY und CDM beobachtet (s. Anhang 6.3.3. Abb. 35).

Zur physiologischen Charakterisierung von *Spy49_1658c* wurden von WT M49 591 und der Deletionsmutante Batch-Kulturen in THY, CDM und DMEM+GlutaMAX™ im Maßstab von 20 ml zur Bestimmung der Wachstumsparameter μ (1/h), td (h) und der Azidifizierungsrate (dpH/dOD_{600nm}) verwendet. Desweiteren wurden Verbrauchsdaten essentieller und nicht-essentieller AS aus einer CDM Batch-Kultur des WT und der Insertionsmutanten 32H3, 68C8 und 90C11 ermittelt.

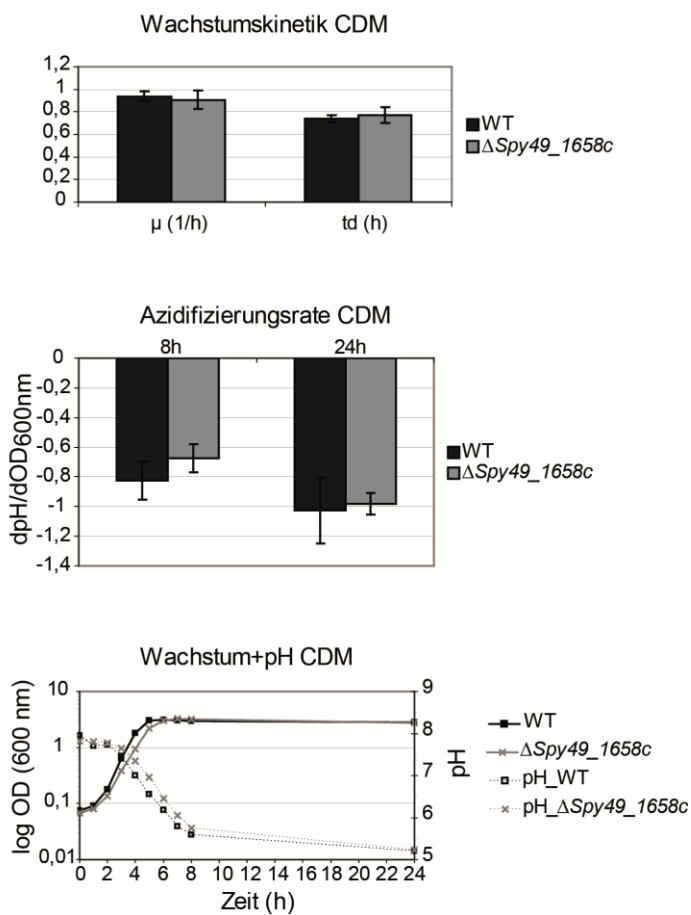
3.7.1. Wachstumskinetik und Azidifizierungsrate von $\Delta Spy49_1658c$ blieben unverändert in THY, CDM und DMEM+GlutaMAX™ im Vergleich zum WT M49 591

In Batch-Kulturen mit einem Gesamtvolumen von 20 ml wurden Wachstumsparameter μ (1/h), td (h) sowie die Azidifizierungsraten (dpH/dOD_{600nm}) für den WT M49 591 und die generierte Deletionsmutante $\Delta Spy49_1658c$ in THY, CDM und DMEM+GlutaMAX™ ermittelt. Dabei gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Stämme in den jeweiligen Medien (Abb. 18 A-C).

A)



B)



C)

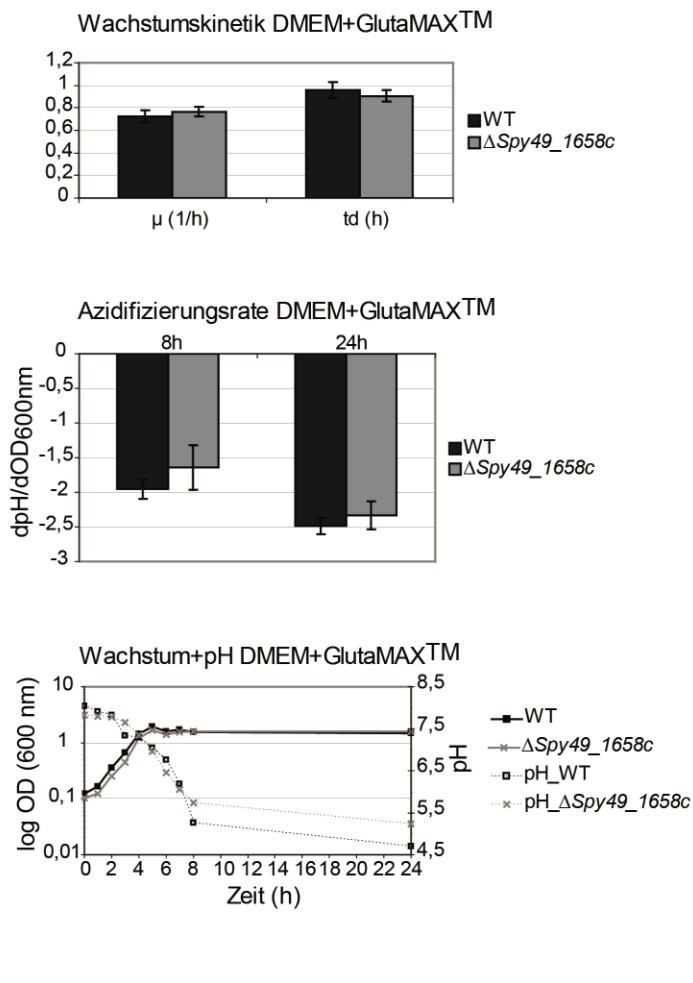


Abb. 18: Zusammenstellung der ermittelten Parameter μ (1/h), td (h) und Azidifizierungsraten für das Wachstum von WT M49 591 und Δ Spy49_1658c.

Das Wachstum erfolgte in 20 ml THY (A), CDM (B) und DMEM+GlutaMAX™ (C) Batch-Kulturen. Darüber hinaus dienten die gemittelten OD_{600nm}- und pH-Daten zur grafischen Darstellung des Wachstums- und pH-Verlauf unter der jeweiligen Bedingung. Die Anzahl unabhängiger Wiederholungen betrug jeweils n = 3.

In Tab. 11 wurden die berechneten Mittelwerte sowie Standardabweichungen für die Wachstumsrate μ , Verdopplungszeit td und Azidifizierungsrate nach acht bzw. 24 Stunden des WT und der Deletionsmutante in den verschiedenen Medien zusammengefasst.

Tab. 11: Gegenüberstellung der berechneten mittleren Wachstumsparameter μ , td und Azidifizierungsraten aus Batch-Kulturen des WT und Δ Spy49_1658c.

Verwendet wurden folgende Medien: THY, CDM und DMEM+GlutaMAX™.

M49 591	THY	CDM	DMEM+GlutaMAX™
μ (1/h)	$0,38 \pm 0,04$	$0,94 \pm 0,04$	$0,73 \pm 0,05$
td (h)	$1,86 \pm 0,18$	$0,74 \pm 0,03$	$0,96 \pm 0,07$
dpH/dOD _{600nm} (8h)	$-0,73 \pm 0,13$	$-0,83 \pm 0,13$	$-1,96 \pm 0,13$
dpH/dOD _{600nm} (24h)	$-0,70 \pm 0,12$	$-1,03 \pm 0,22$	$-2,49 \pm 0,12$

Fortsetzung Tab. 11:

$\Delta Spy49_1658c$	THY	CDM	DMEM+GlutaMAX™
μ (1/h)	$0,32 \pm 0,04$	$0,91 \pm 0,08$	$0,77 \pm 0,04$
td (h)	$2,17 \pm 0,25$	$0,77 \pm 0,07$	$0,91 \pm 0,05$
dpH/dOD _{600nm} (8h)	$-1,05 \pm 0,17$	$-0,68 \pm 0,10$	$-1,64 \pm 0,33$
dpH/dOD _{600nm} (24h)	$-0,93 \pm 0,14$	$-0,98 \pm 0,07$	$-2,33 \pm 0,20$

3.7.2. Verbrauchsdaten essentieller und nicht-essentieller Aminosäuren für M49 591 und *Spy49_1658c::TnSpc* 32H3, 68C8 und 90C11

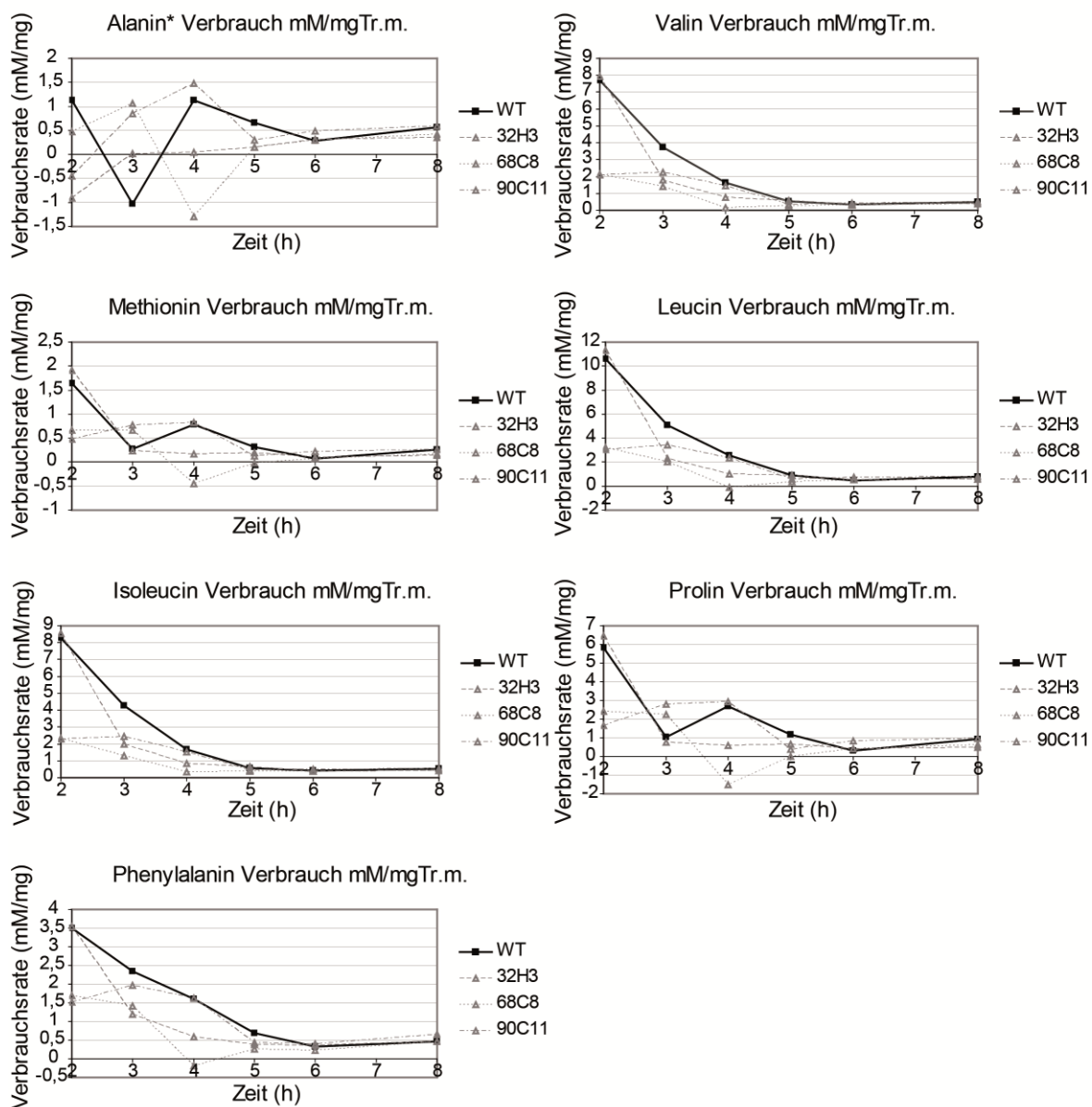
Die Aminosäuresequenz des Genprodukts von *Spy49_1658c* enthält ein Motiv für eine AS-Permease. Um zu überprüfen, ob das Protein den AS-Stoffwechsel beeinflusst, wurden die Verbrauchsdaten essentieller und nicht-essentieller AS für den WT und *Spy49_1658c::TnSpc* ermittelt. Hierfür wurden aus Batch-Kulturen in CDM während der exponentiellen und der stationären Wachstumsphase Proben zur Bestimmung der optischen Dichte (600 nm), pH, Trockenmasse (Tr.m.) und AS-Konz. entnommen. Im Anhang befindet sich eine grafische Gegenüberstellung der Wachstumskurven und der daraus berechneten Parameter μ (1/h), td (h) und Azidifizierungsraten (dpH/dOD_{600nm}) der untersuchten Stämme.

Zur Vereinfachung wurden in Abb. 19 lediglich die ermittelten Verbrauchsdaten in mM/mg Trockenmasse für folgende unpolare AS (Ala*, Val, Met, Leu, Ile, Pro, Phe), polare AS (Tyr, Thr, Gly, Ser, Cys*), basische AS (Lys, Arg, His) und saure AS (Glu*, Asp*) grafisch gegenübergestellt.

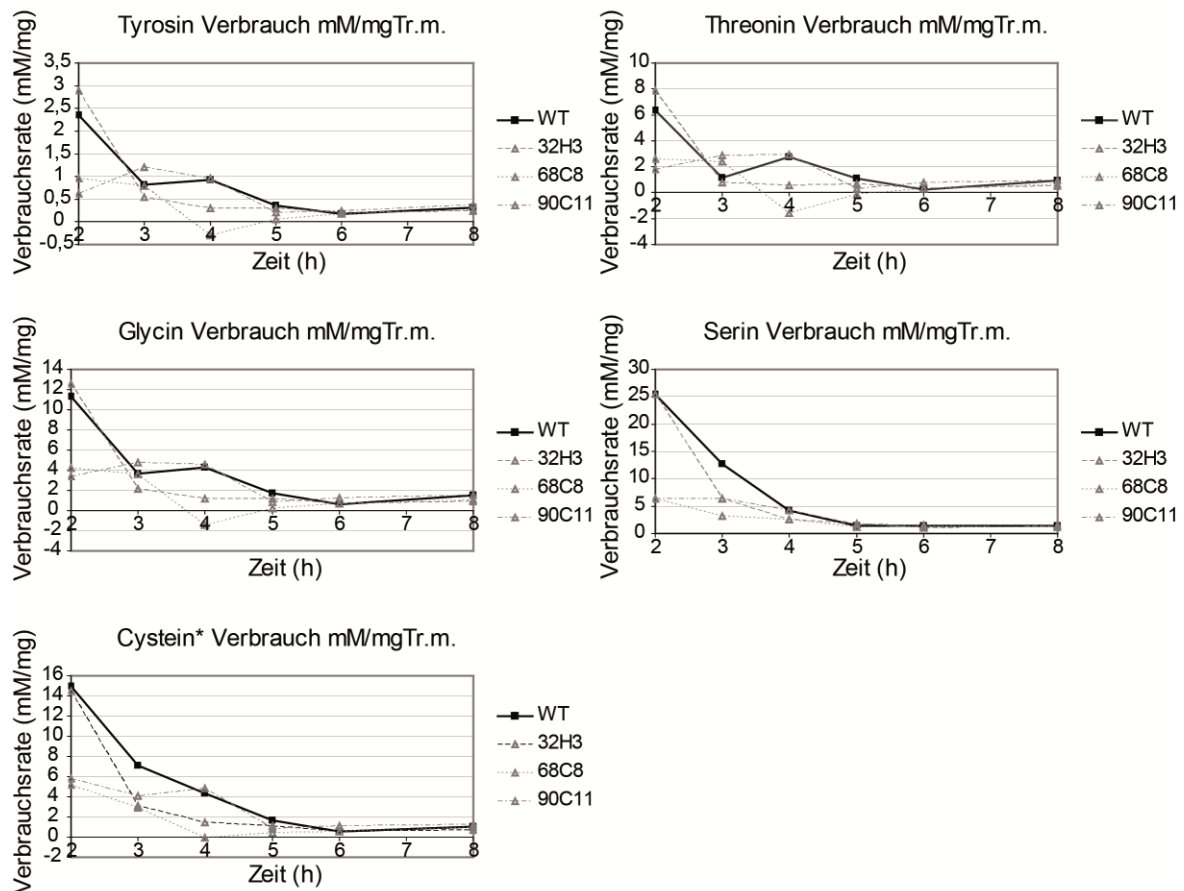
Mit einem * gekennzeichneten AS sind nicht-essentiell für *S. pyogenes*.

Abb. 36 im Anhang unter 6.3.4. zeigt eine grafische Darstellung der berechneten Wachstumsparameter μ , td sowie der Azidifizierungsrate nach acht Stunden des WT und der Transposonstämme. Zusätzlich ist der Wachstumsverlauf und die pH-Änderung des Mediums zu sehen.

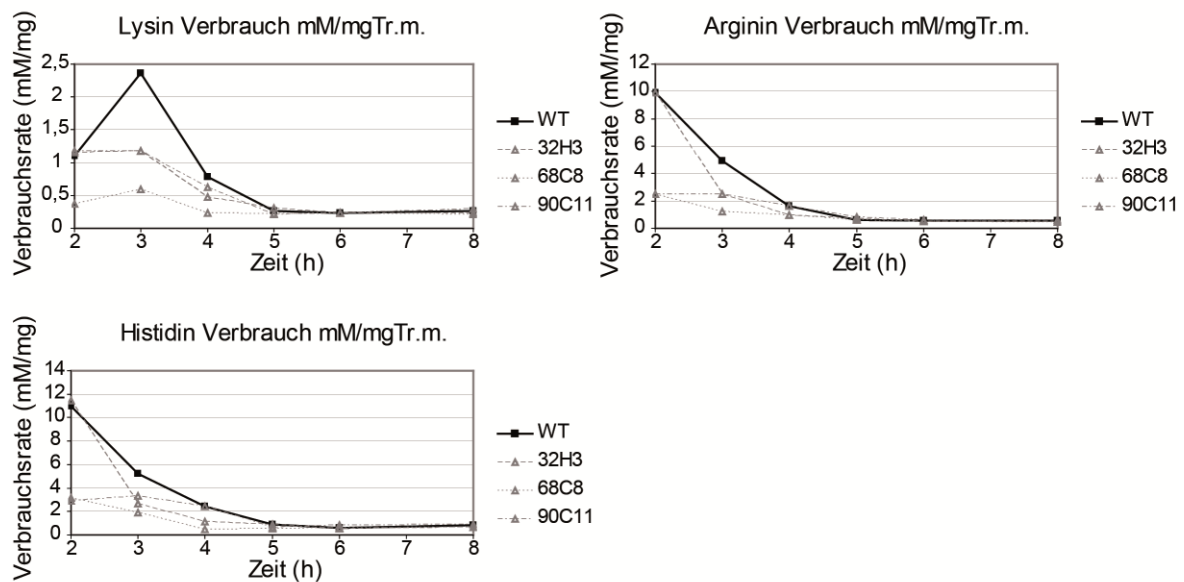
A) unpolare Aminosäuren



B) polare Aminosäuren



C) basische Aminosäuren



D) saure Aminosäuren

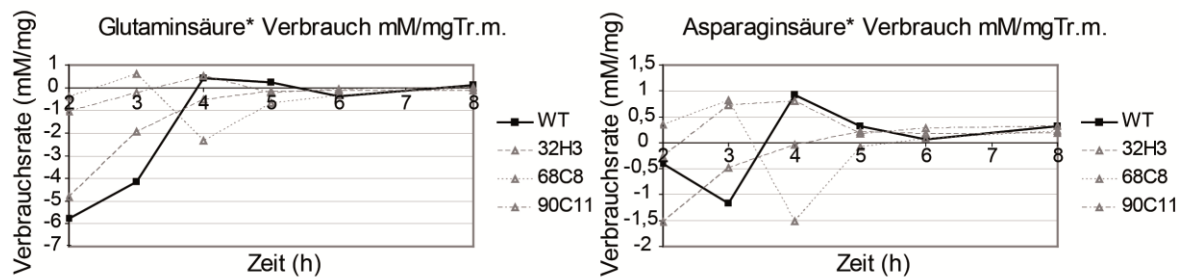


Abb. 19: Der Verbrauch essentieller und nicht-essentieller Aminosäuren durch den WT M49 591 und die *Spy49_1658c::TnSpc* Stämme 32H3, 68C8 und 90C11.

Grafisch Darstellung der Verbrauchsrate als mM pro mg Trockenmasse über die Zeit. Die Probenentnahme erfolgte aus einer 100 ml CDM Batch-Kultur während der exponentiellen Wachstumsphase ($t = 2\text{h}$ bis $t = 6\text{h}$) und zur Endpunkt-Bestimmung nach acht Stunden. Die AS-Konz. wurden mittels HPLC an der Universität van Amsterdam (UvA) durchgeführt. Die mit einem * gekennzeichneten AS sind nicht-essentiell für *S. pyogenes*. Anzahl der Durchführungen $n = 1$.

Von einzelnen Abweichungen abgesehen, konnten zwischen WT und der Transposonmutante 32H3 ähnliche Verbrauchsrate essentieller und nicht-essentieller AS im Wachstumsverlauf beobachtet werden. Dagegen unterschieden sich die Verbrauchsrate während der exponentiellen Wachstumsphase der Mutantenstämme 68C8 und 90C11 zum WT und zu 32H3 deutlich. Mit Ausnahme der sauren nicht-essentiellen AS Glutaminsäure und Asparaginsäure waren die AS-Verbrauchsrate von 68C8 und 90C11 um ein Vielfaches verringert im Vergleich zum WT und 32H3. Mit Eintritt in die stationäre Phase, $t = 6\text{h}$, konnten keine Abweichungen zwischen den Stämmen festgestellt werden und die Verbrauchsrate erreichten ihr Minimum. Die Verbrauchsrate an Glutaminsäure und Asparaginsäure zeigten während des Wachstums einen gänzlich anderen Verlauf. Dies wird besonders beim Glutaminsäureverbrauch deutlich. Hier besaßen WT und 32H3 wieder ähnliche Verbrauchskurven, welche in der exponentiellen Phase mit negativen und um ein Vielfaches verringerten Werten starteten und bis zum Eintritt in die stationäre Phase bis 0 mM/mg Tr.m. anstiegen. Im Gegensatz dazu schwankten die Verbrauchsrate der Transposonstämme 68C8 und 90C11 bereits zu Beginn des exponentiellen Wachstums um den Wert 0 mM/mg Tr.m..

Unter Abschnitt 3.4.1. ist in Abb. 11 zu sehen, dass das integrierte *TnSpc*-Element bei 32H3 sich nah am 3'-Ende von *Spy49_1658c* befindet, bei den Transposonstämmen 68C8 und 90C11 dagegen zentral im Genbereich. Ähnlichkeiten zwischen den AS-Verbrauchsrate des WT und der Transposonmutante 32H3 könnten somit auch auf die Lokalisation des integrierten *TnSpc*-Elements zurückzuführen sein.

Insgesamt zeigte der Vergleich der AS-Verbrauchsdaten bei allen untersuchten AS Unterschiede zwischen WT und Transposonmutanten, mit Ausnahme *Spy49_1658c::TnSp* 32H3. Somit ist eine unmittelbare oder mittelbare Beteiligung von *Spy49_1658c* an einem Aminosäuretransport nicht ausgeschlossen. Da der Wachstumsverlauf und die Wachstumsparameter der Mutantenstämme im Vergleich zum WT keine Defizite aufzeigten (s. Anhang 6.3.4. Abb. 36) ist dem anzunehmenden Aminosäuretransport vermutlich keine essentielle metabolische Funktion zuzuordnen.

3.8. Phänotypanalyse exponentiell wachsender Kulturen von $\Delta Spy49_1658c$

Nachdem das Toleranzverhalten stationärer Kulturen auf Agarplatten mit oxidativen Substanzen (Menadion, H₂O₂) und AMP Colistin untersucht wurde, sollte zusätzlich der Phänotyp von exponentiell wachsenden Kulturen analysiert werden. Hierfür wurden Überlebensraten des WT M49 591 und $\Delta Spy49_1658c$ unter Menadion, H₂O₂ und Colistinstress berechnet. Zusätzlich erfolgte die Konzentrationsbestimmung von Menadion und folgender AMP-Vertreter: hBD3, LL-37 und Protamin für eine mind. 50 %ige Wachstumshemmung von *S. pyogenes* M49 591 und $\Delta Spy49_1658c$.

3.8.1. Menadion-Toleranz von $\Delta Spy49_1658c$ erhöht im Vergleich zum WT

Wie im Methoden-Abschnitt 2.9.1.2. zur Bestimmung der prozentualen Überlebensraten unter oxidativen und AMP-Stress beschrieben, wurden vitale Kulturen aus der mittleren logarithmischen Wachstumsphase verwendet. Durch Bestimmung der KBE vor und nach zweistündiger Stressinduktion, ließ sich der Anteil überlebensfähiger GAS-Zellen in % berechnen. Eine Gegenüberstellung der erhaltenen Überlebensraten in Gegenwart von 600 µg/ml MS, 0,5 mM H₂O₂ und 400 µg/ml Col. für den WT M49 und $\Delta Spy49_1658c$ ist in Abb. 20 zu sehen.

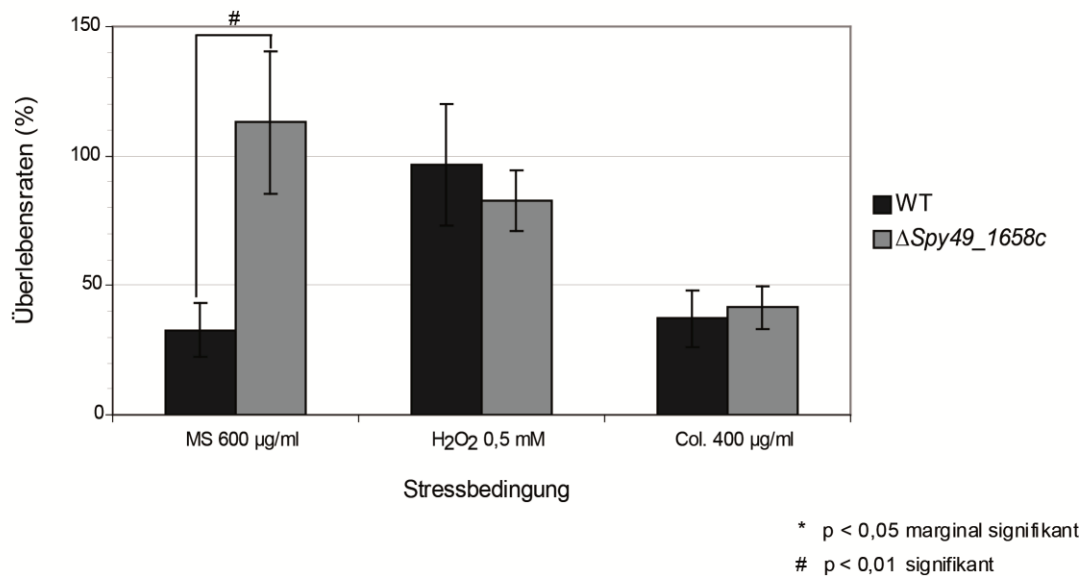


Abb. 20: Prozentuale Überlebensraten der Stämme M49 591 und $\Delta Spy49_1658c$ in Gegenwart von Menadion, H₂O₂ oder Colistin.

Überlebensraten von M49 591 und $\Delta Spy49_1658c$ wurden nach einer zwei-stündigen Inkubation in THY mit 600 µg/ml MS, 0,5 mM H₂O₂ oder 400 µg/ml Colistin ermittelt. Anteil lebender GAS Zellen ergab sich aus dem Verhältnis KBE/ml nach Stressinduktion zu KBE/ml vor Stressinduktion. Es wurden ausschließlich vitale Kulturen aus der exponentiellen Wachstumsphase verwendet. Daten für Mittelwerte und Standardabweichungen ergaben sich aus mind. 3 unabhängigen Wiederholungen des Experiments.

Allein unter oxidativem Stress mit Menadion konnte ein signifikanter Unterschied zw. der Überlebensfähigkeit des WT und der Deletionsmutante $\Delta Spy49_1658c$ festgestellt werden. Der prozentuale Anteil lebensfähiger GAS-Zellen betrug in Gegenwart von 600 µg/ml Menadion für den WT 32,74 (± 10,24) % und für $\Delta Spy49_1658c$ 106,47 (± 27,88) %. Oxidativer Stress ausgelöst durch die Zugabe von 0,5 mM H₂O₂ sowie AMP-Stress im Beisein von 400 µg/ml Colistin zeigten keine signifikanten Unterschiede im Toleranzverhalten von WT und der Deletionsmutante. Die Überlebensraten nach Zugabe von H₂O₂ betrugen für den WT 96,62 (± 23,50) % und für $\Delta Spy49_1658c$ 76,17 (± 17,73) %. Unter Colistin-Stress zeigte der WT eine Überlebensrate von 29,87 (± 9,48) % und $\Delta Spy49_1658c$ von 41,56 (± 8,27) %.

Wenn man sich nochmals die Ergebnisse zum Toleranzverhalten auf Stressagar (Abschnitt 3.6.4.) betrachtet, zeigte sich für die Deletionsmutante eine Übereinstimmung des beobachteten Phänotyps im Bezug auf die gesteigerte Menadion-Toleranz zw. stationären und exponentiell wachsenden Kulturen.

3.8.2. Konz. an Menadion für eine signifikante Wachstumshemmung von mind. 50 % bei $\Delta Spy49_1658c$ verringert im Vergleich zu M49 591

Für *Spy49_1658c* Insertionsmutanten und $\Delta Spy49_1658c$ wurde sowohl für stationäre als auch für exponentiell wachsende Kulturen eine erhöhte Menadion-Toleranz im Vergleich zum WT Stamm M49 591 festgestellt. Auf die Sensitivität gegenüber H_2O_2 und Colistin, als ein Vertreter der Gruppe an AMP, hatte der Funktionsverlust von *Spy49_1658c* jedoch keinen Einfluss. Zusätzlich sollten im 96-Well-Format für eine signifikante Wachstumshemmung von mind. 50 % im WT und $\Delta Spy49_1658c$ die Konz. an Menadion als auch von verschiedenen AMP ermittelt werden. Dies hatte im Vergleich zur Bestimmung von Überlebensraten vitaler Kulturen unter definierten Stressbedingungen folgende Vorteile:

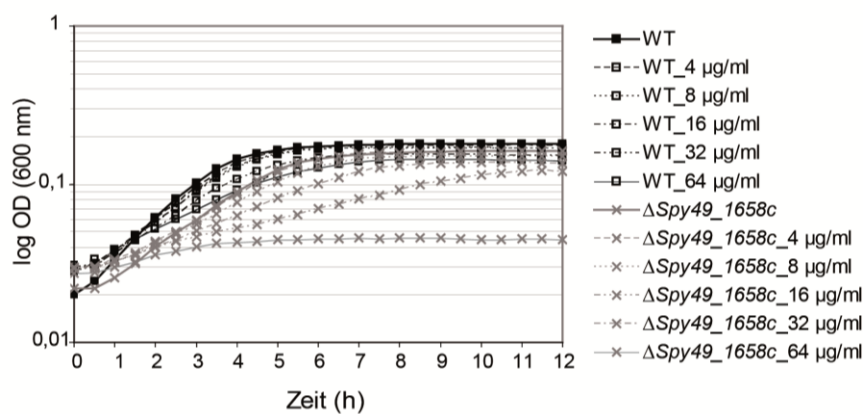
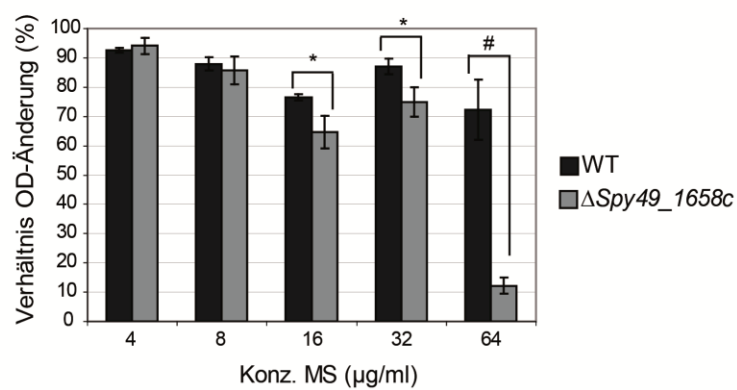
- 1) gleichzeitige Untersuchung mehrerer Stressbedingungen im 96-Well-Format
- 2) Einfluss der Stressfaktoren auf wachsende Kulturen kann unmittelbar verfolgt werden
- 3) zeitsparende experimentelle Auswertung
- 4) geringere Materialkosten durch kleinere Kulturvolumina

THY-Flüssigkulturen des WT und $\Delta Spy49_1658c$ wurden von Beginn an unter oxidativen Stress und AMP-Stress angezogen. Als Vertreter der AMP-Gruppe dienten:

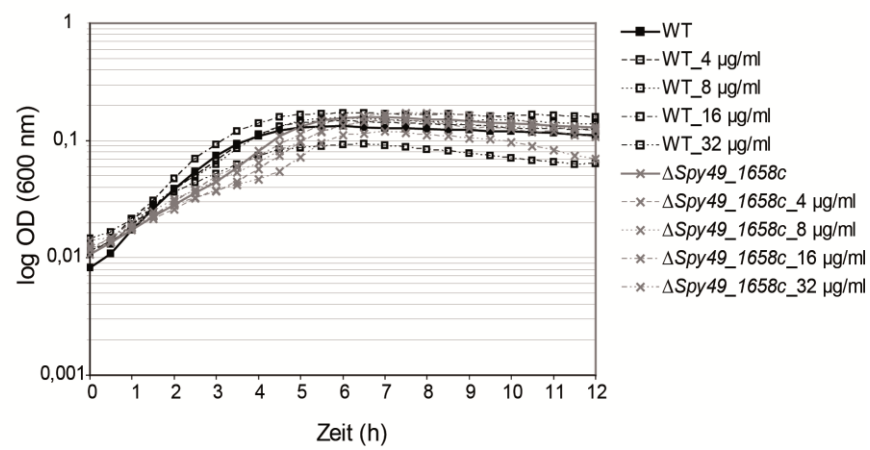
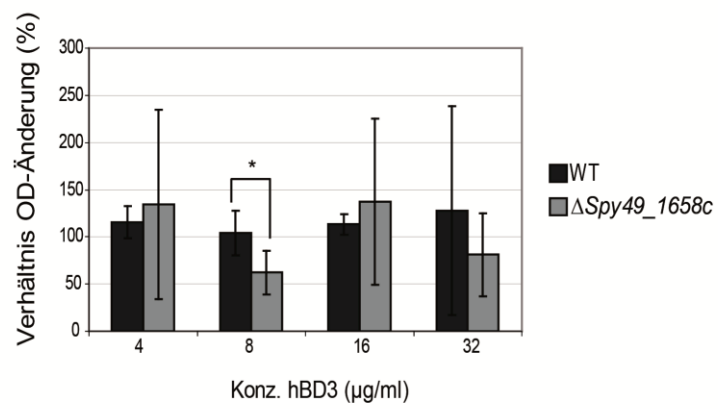
- humanes β -Defensin 3 (hBD3), ein komplexes kationisches Peptid welches gegen gram+ und gram- Bakterien wirkt
- LL-37, ein lineares humanes Peptid aus der Gruppe der Cathelicidine
- Protamin, ein lineares Arginin-reiches Peptid.

Die Stresssubstanzen wurden in einer geometrischen Verdünnungsreihe angesetzt und zu den Kulturen gegeben. Danach wurde das Wachstum im 96-Well-Format über 12 Stunden beobachtet. Es wurde der prozentuale Anteil der OD_{600} -Änderung im Vergleich zur Wachstumskontrolle berechnet. Abb. 21 und Tab. 12 fassen die Ergebnisse zusammen und zeigen zusätzlich die Wachstumskurven in Abhängigkeit von der Konz. der Stresssubstanzen.

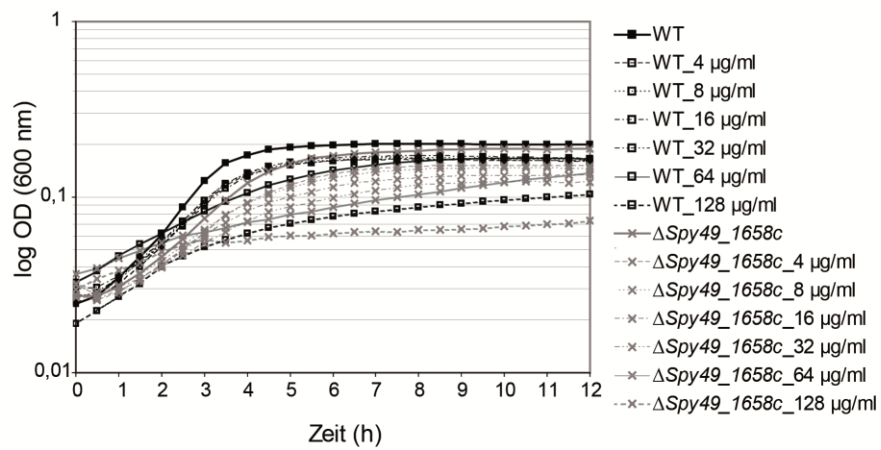
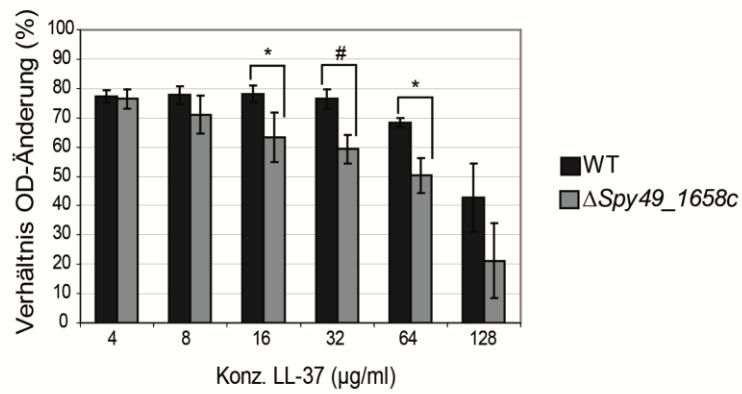
A)



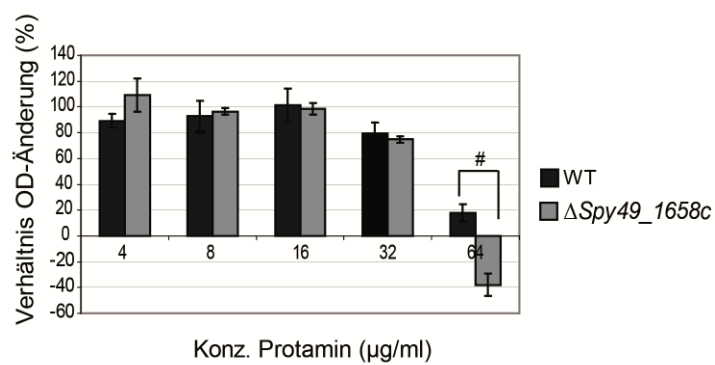
B)



C)



D)



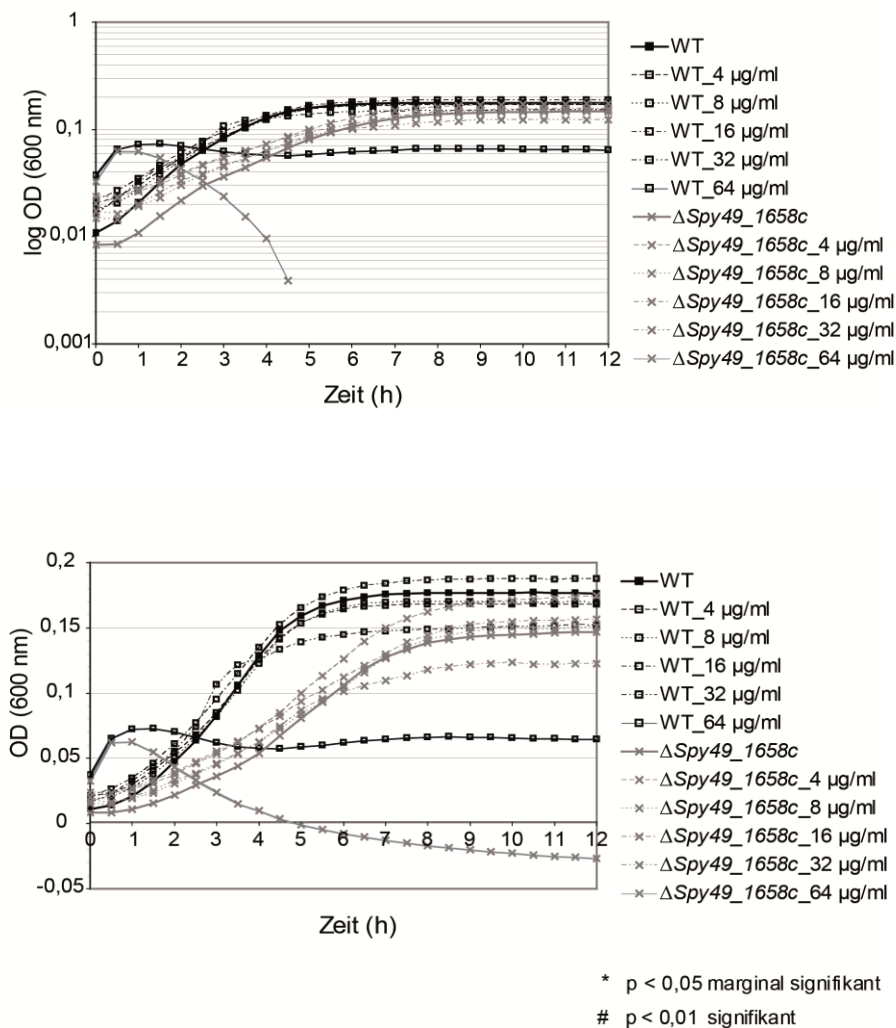


Abb. 21: Wachstumsverhalten des WT M49 591 und der Deletionsmutante $\Delta Spy49_1658c$ in Gegenwart von Menadion und verschiedener AMP.

Im 96-Well Format wurde über einen Zeitraum von 12 Stunden das Wachstum beider Stämme in THY Medium unter den angegebenen Stressbedingungen verfolgt. Zur Ermittlung der Wachstumshemmung wurde die Änderung der optischen Dichte bei 600 nm ($t = 12$ h minus $t = 0$ h) in Gegenwart der jeweiligen Stresssubstanz ins Verhältnis zur Änderung der Zelldichte der Wachstumskontrolle gesetzt. Von A) nach D) sind die prozentualen Anteile der OD₆₀₀-Abnahmen (jeweils oben) sowie die dazu gehörigen Wachstumskurven (jeweils unten) in Gegenwart von MS, hBD3, LL-37 und Protamin zu sehen. Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus $n = 4$ Durchführungen berechnet.

Tab. 12: Prozentualer Anteil des Vermehrungspotentials des WT M49 591 und der Deletionsmutante $\Delta Spy49_1658c$ unter Menadion- und AMP-Stress.

Als Bezug zur Berechnung des prozentualen Vermehrungspotentials diente das Wachstum in Abwesenheit der jeweiligen Stresssubstanz.

MS	4 $\mu\text{g/ml}$	8 $\mu\text{g/ml}$	16 $\mu\text{g/ml}$	32 $\mu\text{g/ml}$	64 $\mu\text{g/ml}$	/
M49 591	92,62 ($\pm 0,86$)	87,95 ($\pm 2,21$)	76,46 ($\pm 1,10$)	87,04 ($\pm 2,62$)	72,36 ($\pm 10,26$)	
$\Delta Spy49_1658c$	94,09 ($\pm 2,83$)	85,73 ($\pm 4,82$)	64,67 ($\pm 5,45$)	74,97 ($\pm 5,09$)	12,20 ($\pm 2,79$)	
hBD3	4 $\mu\text{g/ml}$	8 $\mu\text{g/ml}$	16 $\mu\text{g/ml}$	32 $\mu\text{g/ml}$	/	/
M49 591	115,31 ($\pm 17,28$)	104,45 ($\pm 23,57$)	113,19 ($\pm 10,95$)	128,02 ($\pm 110,52$)		
$\Delta Spy49_1658c$	134,29 ($\pm 100,55$)	62,04 ($\pm 23,19$)	137,18 ($\pm 88,27$)	81,20 ($\pm 43,85$)		
LL-37	4 $\mu\text{g/ml}$	8 $\mu\text{g/ml}$	16 $\mu\text{g/ml}$	32 $\mu\text{g/ml}$	64 $\mu\text{g/ml}$	128 $\mu\text{g/ml}$
M49 591	77,28 ($\pm 2,01$)	77,72 ($\pm 3,04$)	78,01 ($\pm 2,93$)	76,40 ($\pm 3,39$)	68,35 ($\pm 1,69$)	42,75 ($\pm 11,54$)
$\Delta Spy49_1658c$	76,45 ($\pm 3,27$)	71,07 ($\pm 6,49$)	63,23 ($\pm 8,46$)	59,31 ($\pm 4,86$)	50,27 ($\pm 5,96$)	21,18 ($\pm 12,73$)
Protamin	4 $\mu\text{g/ml}$	8 $\mu\text{g/ml}$	16 $\mu\text{g/ml}$	32 $\mu\text{g/ml}$	64 $\mu\text{g/ml}$	/
M49 591	89,29 ($\pm 5,25$)	92,70 ($\pm 12,08$)	101,37 ($\pm 12,65$)	79,44 ($\pm 8,45$)	17,90 ($\pm 6,88$)	
$\Delta Spy49_1658c$	109,15 ($\pm 13,07$)	96,44 ($\pm 2,62$)	98,40 ($\pm 4,55$)	74,80 ($\pm 2,73$)	-37,87 ($\pm 8,93$)	

Wie in Abb. 21 A) und in Tab. 12 zu sehen, konnte beim WT durch Zugabe von Menadion bis zu einer Endkonz. von 64 $\mu\text{g/ml}$ keine signifikante Wachstumshemmung von mind. 50 % beobachtet werden. Dagegen zeigte die Deletionsmutante bereits bei 64 $\mu\text{g/ml}$ Menadion eine Wachstumsreduktion auf 12,20 % der OD₆₀₀-Zunahme ohne Menadion-Zusatz. Signifikante Unterschiede des Wachstums zw. WT und $\Delta Spy49_1658c$ konnten bereits ab 16 $\mu\text{g/ml}$ Menadion beobachtet werden.

Keine Aussage konnte zur hBD3-Konz., bei der eine Wachstumshemmung von mind. 50 % des WT und $\Delta Spy49_1658c$ untersucht werden sollte, getätigt werden. In dem untersuchten Intervall von 4-32 $\mu\text{g/ml}$ hBD3 (Abb. 21 B und Tab. 12) wurden keine signifikanten Unterschiede im Wachstum zwischen beiden Stämmen beobachtet. Lediglich durch Zugabe von 8 $\mu\text{g/ml}$ hBD3 wurde eine signifikante Abschwächung des Wachstums der Deletionsmutante auf 62,04 % der OD_{600nm}-Zunahme ohne Stresssubstanz im Vergleich zum WT beobachtet (Abb. 21 B und Tab. 12). Standardabweichungen von bis zu 100 % des Mittelwertes trugen maßgeblich zum Fehlen von Wachstumsunterschieden zw. beiden Stämmen in dem untersuchten hBD3-Intervall bei.

Neben hBD3 wurde auch ein humanes AMP aus der Gruppe der Cathelicidine, LL-37, auf seine wachstumsinhibitorische Wirkung auf *S. pyogenes* M49 591 und $\Delta Spy49_1658c$ untersucht. Dabei zeigte sowohl der WT als auch die Deletionsmutante eine Wachstumshemmung von mind. 50 % bei LL-37-Konz. von 128 $\mu\text{g/ml}$ (Abb. 21 C und Tab. 12). Im Konz.intervall von 16-64 $\mu\text{g/ml}$ ließen sich jedoch signifikante Unterschiede im Vermehrungspotential zw. WT und Mutante feststellen (Abb. 21 C).

In dem untersuchten Konz.intervall von Protamin ließen sich keine Unterschiede zw. WT und Deletionsmutante, bezüglich einer signifikanten Wachstumshemmung von mind. 50 %, erkennen (Abb. 21 D und Tab. 12). Im Konz.intervall von 32 $\mu\text{g/ml}$ bis 64 $\mu\text{g/ml}$ Protamin kam es bei beiden Stämmen zu einer Abnahme des Wachstumspotentials von 79,44 ($\pm 8,45$) % auf 17,90 ($\pm 6,88$) % beim WT und von 74,80 ($\pm 2,73$) % auf -37,87 ($\pm 8,93$) % bei $\Delta Spy49_1658c$. In Gegenwart von 64 $\mu\text{g/ml}$ Protamin wurde der einzige signifikante Unterschied im Wachstum von WT und Mutante beobachtet (Abb. 21 D).

Allein durch Zugabe von Menadion konnte in der Deletionsmutante $\Delta Spy49_1658c$ ein Unterschied in der Wachstumshemmung von mind. 50 % im Vergleich zum WT festgestellt werden. Im Gegensatz zum Phänotyp stationärer und exponentiell wachsender Kulturen zeigte die Deletionsmutante in diesen Versuchen eine zum WT signifikant erhöhte Sensitivität, was sich durch eine Abnahme der Menadion-Konz. für eine signifikante Wachstumshemmung von mind. 50 % äußerte.

Des Weiteren wurden Wachstumsunterschiede zw. WT und $\Delta Spy49_1658c$ durch Zugabe verschiedener Gruppen an AMP beobachtet. Die Konz. an LL-37 und Protamin, welche eine signifikante Wachstumshemmung von mind. 50 % bewirkten, blieb jedoch im Vergleich zum WT unverändert. Da in dem untersuchten Konzentrationsintervall von 4-64 $\mu\text{g/ml}$ hBD3 eine signifikante Reduktion des Wachstumspotentials von mind. 50 % im WT und in der Deletionsmutante nicht erreicht wurde, sind hier weitere Experimente mit hBD3 Konz. über 64 $\mu\text{g/ml}$ notwendig.

3.9. Signifikant verringerte Oberflächenhydrophobizität von $\Delta Spy49_1658c$

Da ein Zusammenhang zwischen der bakteriellen Oberflächenhydrophobizität und der Empfänglichkeit gegenüber polaren Verbindungen, wie z. B. reaktiven Sauerstoffverbindungen (ROS) und AMP, besteht, wurde auch dieser Aspekt mit Hilfe von n-Hexadecan untersucht.

Die Darstellung der relativen Hydrophobizität zu n-Hexadecan in % erfolgte in Abb. 22. Für die Deletionsmutante $\Delta Spy49_1658c$ konnte eine signifikant geringere Oberflächenhydrophobizität als für den WT ermittelt werden. Im Mittel betrug die relative Oberflächenhydrophobizität für den WT 56,92 ($\pm 4,82$) % und für $\Delta Spy49_1658c$ 30,11 ($\pm 7,66$) %. Die verringerte Hydrophobizität der Zelloberfläche von $\Delta Spy49_1658c$ könnte somit das veränderte Toleranzverhalten gegenüber Menadion erklären.

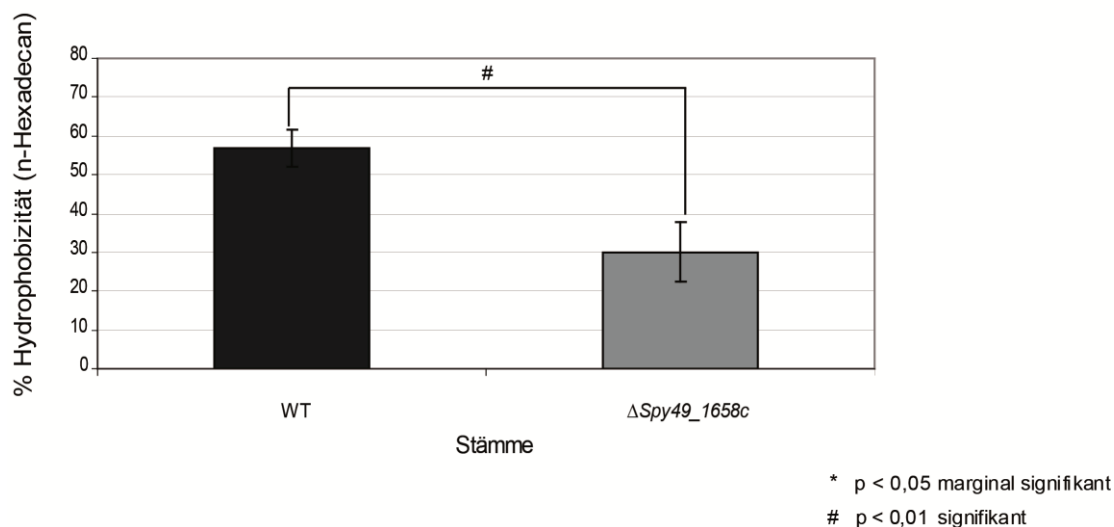


Abb. 22: Prozentuale Oberflächenhydrophobizität der Stämme M49 591 und $\Delta Spy49_1658c$ in Bezug zu n-Hexadecan.

Die Anzahl der unabhängigen Wiederholungen betrug für beide Stämme $n = 4$.

Zudem konnte für die $Spy49_1658c::TnSpc$ Stämme 68C8 und 90C11 ebenfalls eine zum WT signifikant verringerte Hydrophobizität der Zelloberfläche mit Hilfe von n-Hexadecan nachgewiesen werden (s. Anhang 6.3.5.). Für die Insertionsmutante 32H3 traf dies jedoch nicht zu (s. Anhang 6.3.5.).

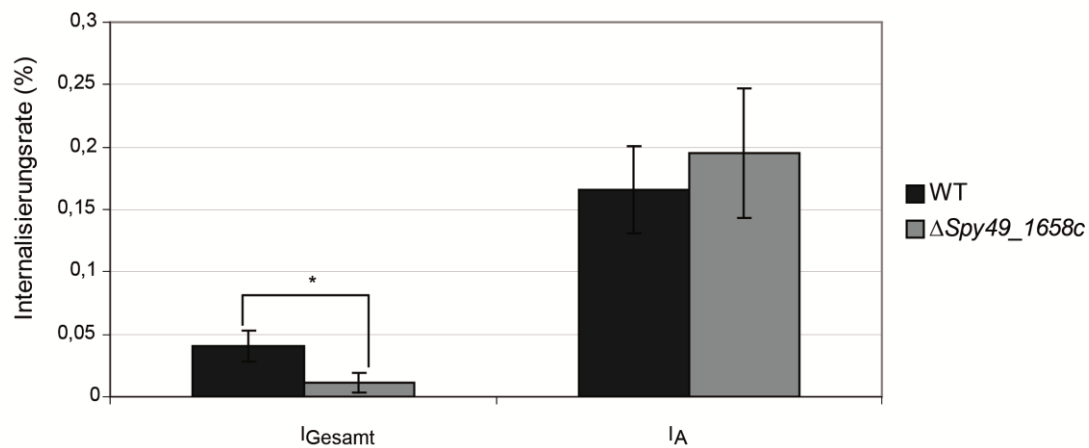
3.10. Virulenzverhalten von $\Delta Spy49_1658c$

Die Produktion von ROS spielen im menschlichen Organismus bei der Abwehr bakterieller Infektionen eine wesentliche Rolle. Durch *in vitro* Experimente mit humanen Keratinozyten, humanem Vollblut und einer murinen Monozyten/Makrophagen Zelllinie sollte geklärt werden, ob der Verlust von $Spy49_1658c$ neben dem veränderten Toleranzverhalten gegenüber Menadion auch einen Einfluss auf die GAS-Virulenz ausübt.

3.10.1. Verändertes Adhärenzvermögen von $\Delta Spy49_1658c$ an humane Keratinozyten HaCaT

In einem Invasionsassay mit humanen Keratinozyten der permanenten Zelllinie HaCaT wurden die prozentualen Anteile an im Überstand befindlicher, adhärenter und internalisierter Zellen des WT M49 591 und $\Delta Spy49_1658c$ berechnet. Zur Veranschaulichung wurden die erhaltenen Ergebnisse in einem Säulendiagramm (Abb. 23) dargestellt. Zudem wurde auch die Differenz aus der Summe nicht-adhärenter, adhärenter und internalisierter *S. pyogenes* Zellzahl zur eingesetzten Gesamtzellzahl dargestellt (Abb. 23 B).

A)



B)

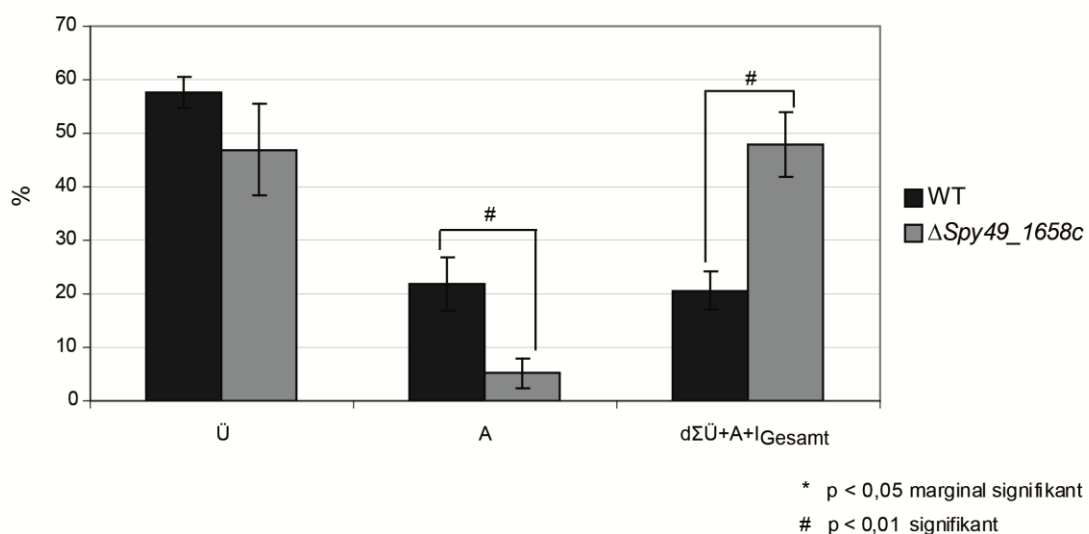


Abb. 23: Adhärenz/Internalisierungsverhalten von WT M49 591 und $\Delta Spy49_1658c$ an humane Keratinozyten HaCaT.

S. pyogenes und HaCaT-Zellen wurden zur Berechnung der Anteile nicht-adhärenter/im Überstand befindlicher, adhärenter und internalisierter Zellen 2h koinkubiert (siehe Methoden

Abschnitt 2.9.6). Dabei betrug die MOI zwischen eukaryotischen und bakteriellen Zellen 1:15. A) Prozentualer Anteil internalisierter GAS-Zellen. Zum einen berechnet auf die Gesamtmenge eingesetzter GAS-Zellen (I_{Gesamt}) und zum anderen auf die Anzahl adhärenter bakterieller Zellen (I_A). B) Zeigt die Überlebensraten aus dem Experiment zur Koinfektion mit HaCaT-Zellen. Angegeben wurden die Anteile (%) nicht-adhärenter (\ddot{U}) und adhärenter (A) Zellen des WT und der Deletionsmutante sowie die Differenz aus der Summe $\ddot{U}+A+I_{\text{Gesamt}}$ zur eingesetzten Bakterien-Gesamtzellzahl und damit 100 % ($d\Sigma\ddot{U}+A+I_{\text{Gesamt}}$). Anzahl der Versuchsdurchführungen $n = 4$.

Betrachtet man die Anteile internalisierter *S. pyogenes*-Zellen, wird deutlich das signifikant weniger Zellen von $\Delta Spy49_1658c$ im Vergleich zum WT in die Keratinozyten gelangten (s. Abb. 23A I_{Gesamt}). I_{Gesamt} betrug für $\Delta Spy49_1658c$ $0,012 (\pm 0,008) \%$ und für den WT $0,040 (\pm 0,012) \%$. Der Anteil internalisierter Zellen in Bezug auf den Anteil adhärenter Zellen war zwischen beiden Stämmen jedoch nicht signifikant verschieden (Abb. 23A I_A). Für den WT wurde eine Internalisierungsrate von $I_A = 0,166 (\pm 0,035) \%$ und für die Deletionsmutante von $I_A = 0,195 (\pm 0,052) \%$ ermittelt. Daraus kann man schließen, dass *Spy49_1658c* auf den Internalisierungsprozeß selbst keinen Einfluss ausübte. Da der Anteil adhärenter $\Delta Spy49_1658c$ -Zellen zum WT ebenfalls signifikant verringert war (s. Abb. 23B A-Werte), ist anzunehmen, dass die verminderte Adhärenzrate der Mutante auch den Unterschied in I_{Gesamt} zw. beiden Stämmen verursachte. A_{WT} betrug $21,76 (\pm 5,03) \%$ und $A_{\Delta Spy49_1658c}$ $5,22 (\pm 2,79) \%$.

Der Anteil nicht-adhärenter, also im Überstand befindlicher, *S. pyogenes*-Zellen (\ddot{U} -Werte) war für beide Stämme nicht-signifikant verschieden und betrug für den WT $\ddot{U}_{\text{WT}} = 57,57 (\pm 2,88) \%$ und die Mutante $\ddot{U}_{\Delta Spy49_1658c} = 46,91 (\pm 8,49) \%$. Beeinflusste der Verlust von *Spy49_1658c* lediglich das Adhärenzpotential von *S. pyogenes* M49, hätten die Anteile an im Überstand befindlicher GAS Zellen zw. den Stämmen, bei vorausgesetzt gleichbleibenden Vermehrungsraten beider Stämme, ebenfalls signifikant voneinander abweichen müssen. Im Zellkulturmedium allein, ohne HaCaT, war die Replikation und somit das Wachstum beider Stämme nicht-signifikant verschieden (s. Anhang 6.3.5. Abb. 37).

Durch Berechnung der Differenzanteile aus der Summe $\ddot{U}+A+I_{\text{Gesamt}}$ zur eingesetzten GAS-Gesamtzellzahl ($d\Sigma\ddot{U}+A+I_{\text{Gesamt}}$) wurde der Unterschied zw. WT M49 591 und $\Delta Spy49_1658c$ im Infektionsversuch mit humanen Keratinozyten nochmals grafisch dargestellt. Die berechneten Differenzanteile ($d\Sigma\ddot{U}+A+I_{\text{Gesamt}}$) verhielten sich umgekehrt proportional zum Adhärenz- und Internalisierungsanteil selbst. Verantwortlich hierfür könnte eine zum WT erhöhte Abtötungsrate oder eine verringerte Wachstumsrate von $\Delta Spy49_1658c$ in Gegenwart von HaCaT gewesen sein.

3.10.2. Überlebens-effizienz von $\Delta Spy49_1658c$ in humanen Vollblut stark vermindert

Nach einer dreistündigen Inkubation in menschlichem Vollblut diente ein Vergleich des Multiplikationsfaktors des WT M49 591 und der Deletionsmutante $\Delta Spy49_1658c$ zur Identifizierung von Abweichungen im Virulenzverhalten beider Stämme. Eine Gegenüberstellung der berechneten Mittelwerte für die Multiplikationsfaktoren des WT und $\Delta Spy49_1658c$ aus fünf unabhängigen Versuchsdurchführungen ist in Abb. 24 zu sehen. Der WT besaß für die dreistündige Inkubation in Vollblut eine mittlere Vermehrungsrate von 28,67 ($\pm 0,99$) und die Mutante von 9,13 ($\pm 1,09$). In Vollblut traten durch den Verlust von $Spy49_1658c$ in *S. pyogenes* signifikante Wachstumsdefizite auf.

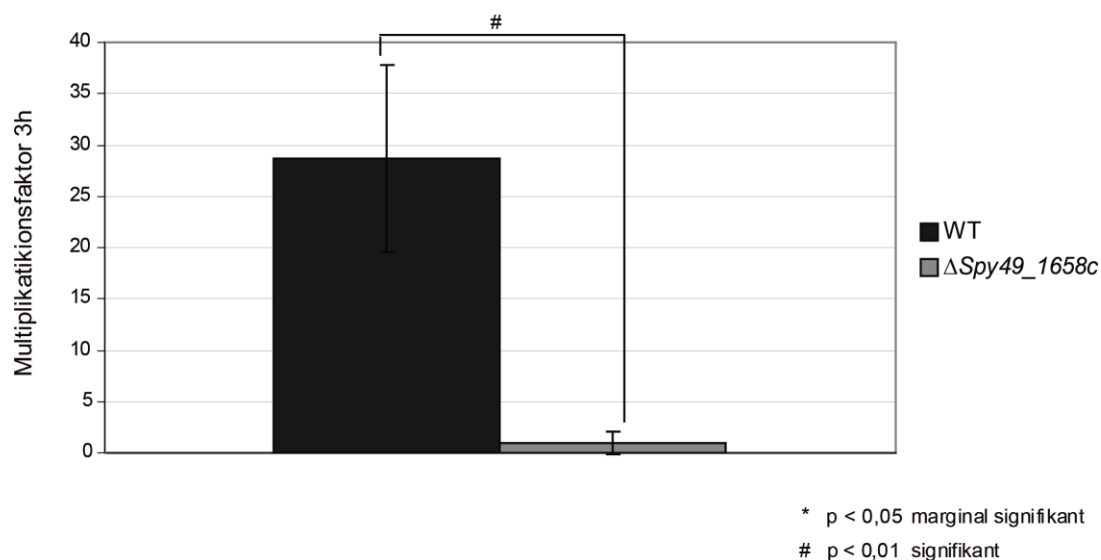


Abb. 24: Überlebensfähigkeit der Stämme M49 591 und $\Delta Spy49_1658c$ nach dreistündiger Inkubation in humanem Vollblut.

Der Multiplikations- oder Vermehrungsfaktor entsprach dem Verhältnis der KBE-nach Blutinkubation zur jeweiligen Ausgangs-KBE. Anzahl unabhängiger Versuchsdurchführungen betrug $n = 5$.

3.10.3. $Spy49_1658c$ zeigte keinen Einfluss auf die Phagozytoserate von J774A.1 Monozyten-Makrophagen

Während der angeborenen Immunantwort kommt es durch phagozytische Zellen, wie Makrophagen und polymorphkernige Granulozyten (PMNs), unter anderem durch die Bildung von ROS oder AMPs zur Zerstörung bakterieller Eindringlinge. Experimente zum Verhalten unter oxidativem Stress von $\Delta Spy49_1658c$ zeigten eine vom WT abweichende Empfänglichkeit gegenüber dem Superoxid-Anionen-Bildner Menadion. Darüber hinaus

wurde in Virulenzversuchen ein signifikant verringertes Adhäsionspotential an/in humane Keratinozyten sowie in menschlichem Vollblut eine signifikant abgeschwächte Überlebensfähigkeit beobachtet. In Untersuchungen mit der murinen Monozyten-Makrophagen Zelllinie J774A.1 sollte geklärt werden, ob auch die Effizienz zur Phagozytose von WT und $\Delta Spy49_1658c$ voneinander abweicht. Hierfür wurden bakterielle und eukaryotische Zellen für 30 min koinkubiert und anschließend das Verhältnis aus $KBE_{t=30'}$ ohne J774A.1 und KBE für die im Überstand und intrazellulär aufgefundenen Bakterien ermittelt. Der Vergleich der prozentualen Anteile wurde in Abb. 25 grafisch dargestellt. In das Diagramm wurde der verbleibende prozentuale Anteil aus der Summe: $\ddot{U}+I$ zur GAS-Gesamtmenge integriert.

Diskrepanzen im Replikationspotential zw. WT und $\Delta Spy49_1658c$ im Zellkulturmedium DMEM+GlutaMAXTM+Pyruvat von J774A.1 konnten durch Berechnung des Multiplikationsfaktors ausgeschlossen werden (s. Anhang 6.3.6. Abb. 38).

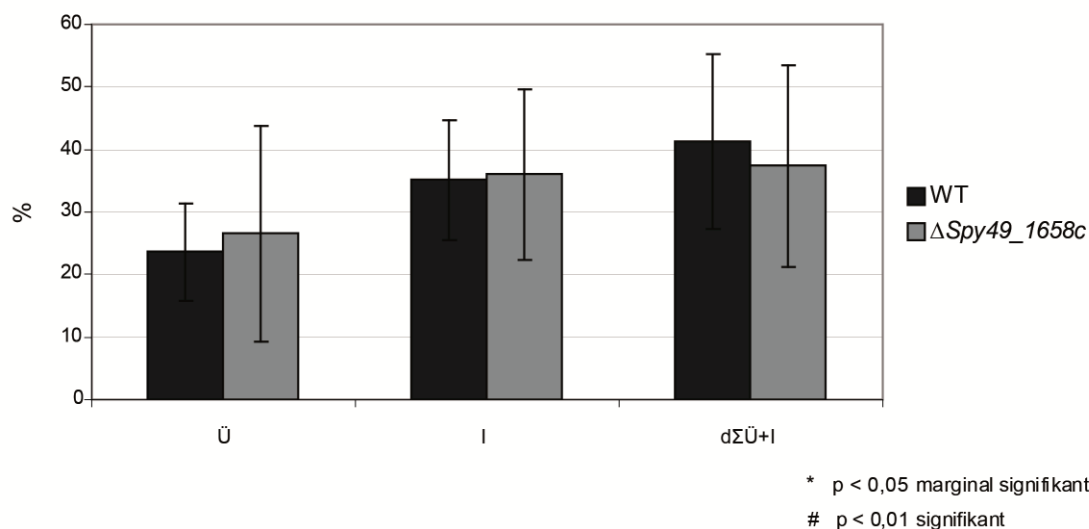


Abb. 25: Phagozytoseassay mit murinen Monozyten-Makrophagen J774A.1 und *S. pyogenes* M49 591 bzw. $\Delta Spy49_1658c$.

Gegenüberstellung der prozentualen Anteile der im Überstand befindlichen (Ü) und internalisierten (I) Zellen des WT M49 591 und $\Delta Spy49_1658c$ nach 30minütiger Koinkubation mit J774A.1-Zellen. Darüber hinaus wurde auch die Differenz zw. *S. pyogenes*-Gesamtmenge und der Summe aus $\ddot{U}+I$ ($d\Sigma\ddot{U}+I$) dargestellt. Die eingesetzte MOI betrug 1:1. Die Anzahl unabhängiger Wiederholungen $n = 4$.

Weder zwischen den prozentualen Anteilen der im Überstand noch der intrazellulär in J774A.1 aufgefundenen GAS-Zellen des WT und der Deletionsmutante $\Delta Spy49_1658c$ konnten signifikante Unterschiede festgestellt werden. Im Überstand wurden nach einer

30minütigen Inkubation mit J774A.1 noch 23,57 ($\pm 7,70$) % der WT M49 Gesamtmenge und 26,58 ($\pm 17,25$) % der $\Delta Spy49_1658c$ Gesamtmenge aufgefunden. Von J774A.1 phagozytiert wurden 35,17 ($\pm 9,59$) % der WT M49 und 36,07 ($\pm 13,65$) % von $\Delta Spy49_1658c$.

Die zusätzlich berechnete Differenz aus der Summe $\ddot{U}+I$ zur GAS-Gesamtmenge in % war demzufolge ebenfalls nicht-signifikant verschieden zw. den beiden Stämmen. Für den WT M49 betrug diese 41,26 ($\pm 14,06$) % und für die Deletionsmutante 37,35 ($\pm 16,20$) %.

Der Verlust von $Spy49_1658c$ hatte keine Auswirkungen auf das Phagozytosepotential der murinen Monozyten-Makrophagen J774A.1.

4. Diskussion

Umfangreiche Transposonmutantenbanken im Stamm M18 8232 und im Stamm M49 591 von *S. pyogenes* dienten zur Identifizierung unbekannter Virulenzfaktoren zur Kompensation von oxidativem und AMP-Stress. ROS und AMPs stellen effektive Hilfsmittel des menschlichen Immunsystems zur Inaktivierung und Abwehr pathogener Organismen dar. Wie *S. pyogenes* in Gegenwart von ROS und AMPs überleben kann, ist jedoch noch nicht vollständig geklärt.

4.1. Charakterisierung des Transposonsystems TnSpc

Lyon *et al.* (1998) und Gibson und Caparon (2002) konnten zeigen, dass die Derivate des Transposonsystems Tn4001, TnSpc und TnFuZ, mit einer hohen Effizienz und zufällig in das Genom von *S. pyogenes* integrieren. Für TnSpc wurde eine Insertionsfrequenz von 10^3 bis 10^5 Transformanten pro μg DNA (Lyon *et al.* 1998) und für TnFuZ von 10^2 bis 10^4 Insertionsmutanten pro μg DNA (Gibson und Caparon 2002) angegeben. Während dieser Arbeit diente TnSpc zum Aufbau von Mutantenbanken in den Serotypen M18 und M49 von *S. pyogenes*. Durch Southern-Blot Analysen ließ sich in beiden Serotypen ein zufälliger Einbau des Transposonelementes nachweisen. Darüber hinaus lag die Insertionsfrequenz zwischen $2 \cdot 10^2$ bis $4 \cdot 10^2$ Transformanten pro μg Plasmid-DNA. Somit entsprechen die hier gezeigten Ergebnisse den von Lyon *et al.* (1998) und Gibson und Caparon (2002) veröffentlichten Daten. TnSpc integriert mit hoher Effizienz und zufällig in das Genom von *S. pyogenes* unabhängig vom Serotyp.

4.2. Selektion von TnSpc-Mutanten unter oxidativem Stress

ROS, wie z. B. Superoxidanionen (O_2^-) und Hydroxylradikale (OH^\cdot), sind an der Abwehr bakterieller Invasoren beteiligt. Epithelzellen der Atemwege aber auch Keratinozyten nutzen oxidativen Stress zur Abtötung bakterieller Eindringlinge (Rochelle *et al.* 1998, Grange *et al.* 2009). Als ein Bestandteil der angeborenen Immunantwort synthetisieren neutrophile Granulozyten und Makrophagen ROS zur Abtötung phagozytierter Organismen. Eine veränderte Empfänglichkeit gegenüber oxidativen Stress stellt somit einen wichtigen Virulenzmarker pathogener Mikroorganismen, wie *S. pyogenes*, dar. Aus diesem Grund

wurde oxidativer Stress, erzeugt durch die Zugabe von Menadion oder H₂O₂, zur Selektion virulenzrelevanter Mutanten verwendet.

4.2.1. Serotyp-abhängige Unterschiede in der Anzahl Menadion- und H₂O₂-sensitiver TnSpc Mutanten

Im Selektionsverfahren unter oxidativem Stress konnte in Serotyp M49 eine höhere Anzahl an TnSpc-Stämmen mit einer im Vergleich zum WT erhöhten Sensitivität gegenüber Menadion u./o. H₂O₂ isoliert werden als in Serotyp M18. Unter anderem war die Anzahl an Menadion- und Menadion/H₂O₂-sensitiven Transposonstämmen in Serotyp M49 um das drei bis vierfache erhöht im Vergleich zu M18 (s. Tab. 8 unter 3.2.2.). Von *S. pyogenes* sind mehr als 100 verschiedene M-Serotypen bekannt, mit einer zum Teil hohen chromosomalen Diversität zwischen den einzelnen Serotypen und auch innerhalb eines M-Serotyps (Musser *et al.* 1991; Chaussee *et al.* 1996; Facklam *et al.* 1999; Hoe *et al.* 1999). Hauptsächlich Phagen und Phagen-verwandte Gensequenzen sind für diesen hohen Grad an genetischer Diversität verantwortlich, welche auch zu Unterschieden in Pathogenität und Virulenz zwischen den *S. pyogenes* Serotypen beitragen (Musser *et al.* 1991), da diese Elemente unter anderem Gensequenzen für virulenzassoziierte Proteine beinhalten. In Serotyp M18 MGAS8232 z. B. kodieren sieben Phagensequenzen für 10 Toxine oder putative Virulenzfaktoren (Smoot *et al.* 2002). Jedoch sorgen auch phagenunabhängige Gensequenzen, welche den verschiedenen Serotypen einen Vorteil im Überleben und in der Fitness in der jeweiligen bevorzugten Umwelt vermitteln, für die genetische Variabilität von *S. pyogenes*. Die Nudix Hydrolase, welche innerhalb der *emm*-ähnlichen Pathogenitätsregion zu finden ist und einen Beitrag zur Beseitigung giftiger Substanzen sowie zur Wirtszellinvasion leistet, tritt spezifisch in Serotyp M49 und M82 auf (McShan *et al.* 2008). Aufgrund dieser Variabilität sind die hier beobachteten Unterschiede in der Anzahl Menadion- u./o. H₂O₂-sensitiver TnSpc Stämme zwischen den beiden Serotypen M18 und M49 nicht verwunderlich. Zumal beide Serotypen auch durch eine voneinander abweichende Pathogenität gekennzeichnet sind. So ist M18 8232 ein Isolat aus einem Patienten mit akutem rheumatischem Fieber und M49 591 ein Hautisolat.

4.3. Lokalisation von Tn*Spc* in M18- und M49-Mutanten mit veränderter Empfänglichkeit gegenüber Menadion u./o. H₂O₂ u. Colistin

Tn*Spc*-Stämme mit einem WT-divergenten Phänotyp und einer einmaligen Insertion des Transposonelements wurden zur Identifizierung der Transposoninsertionsstelle näher untersucht. In beiden Serotypen konnten Gene für den Metabolismus, zur DNA-Synthese bzw. Reparatur von DNA-Schäden sowie intergenische Bereiche identifiziert werden (s. 3.2.3.3. Tab. 9).

Die betroffenen metabolischen Gene waren zum einen in Serotyp M18 *manA* (Mannose-6-Phosphatisomerase) und zum anderen in M49 *folC.2* (Dihydrofolatsynthase /Folylpolyglutamatsynthase). Die M18 *manA::TnSpc* Insertionsmutante zeigte in den Selektionsdurchgängen auf Stressagar mit definierten Zelldichten ein abgeschwächtes Toleranzverhalten gegenüber Menadion im Vergleich zum WT. Eine mit Hilfe von KEGG durchgeführte Analyse von ManA identifizierte zwei Phosphomannose Isomerase Typ I Motive. Yeom *et al.* konnten nach einer Strukturanalyse für eine Typ I Mannose-6-Phosphat Isomerase des Organismus *Thermus thermophilus* vier Metallbindedomänen vorhersagen. Die Transposoninsertion in *manA* könnte zu einem intrazellulären Anstieg frei zugänglicher Metallionen, wie z. B. Eisen, Mangan oder Zink, geführt haben. Regulationsmechanismen zur Aufrechterhaltung des intrazellulären Gleichgewichtes, oder Homöostasis, an Metallionen sind eng an Abwehrmechanismen gegenüber oxidativen Stress gekoppelt (Storz und Imlay 1999; Touati 2000; Moore *et al.* 2005; Helmann 2005; Brenot *et al.* 2007). Dies ist auch von wesentlicher Bedeutung, da das menschliche Immunsystem zur Abwehr pathogener Organismen oxidativen Stress und die Erzeugung von Metallmangelbedingungen nutzt.

Dennoch scheint es eher unwahrscheinlich, dass ein intrazellulärer Anstieg an frei zugänglichen Metallionen, eventuell ausgelöst durch den ManA-Verlust, lediglich das Toleranzverhalten gegenüber des Superoxidproduzenten Menadion und nicht auch gegenüber H₂O₂ beeinflusst hat. Zum Beispiel würde eine erhöhte Eisenkonzentration in Gegenwart von H₂O₂ die Fenton-Reaktion und somit die Bildung von Hydroxylradikalen begünstigen, welche als ROS Biomoleküle wie Fette, Kohlenhydrate, Proteine und DNA oxidieren. In diesem Fall wäre mit einer erhöhten Sensitivität gegenüber H₂O₂ zu rechnen. Durch den Austausch von Eisen durch Mangan in katalytischen Untereinheiten von Proteinen kann die H₂O₂-Empfindlichkeit verringert werden. Die Mangan-abhängige Superoxid-Dismutase ist an der Reduktion von Sauerstoffradikalen, wie Superoxid (O₂^{•-}) und Superoxid-Anionen (O₂²⁻),

beteiligt und Manganbikarbonatkomplexe können direkt ROS reduzieren (Yesilkaya *et al.* 2000; Daly *et al.* 2004). Ein Anstieg der intrazellulären Mangankonzentration würde somit zu einer erhöhten Toleranz gegenüber oxidativen Stress, ausgelöst durch H₂O₂ und Menadion, führen. In *B. subtilis* führte die Inaktivierung des Zink-Importers ZosA zu einem Anstieg der Sensitivität gegenüber Peroxidstress (Gaballa und Helmann 2002).

Wahrscheinlicher ist, dass der metabolische Funktionsverlust von ManA infolge der Tn*Spc*-Insertion die ausschlaggebende Ursache für die verstärkte Menadion-Sensitivität in der M18 Tn*Spc* Insertionsmutante war. ManA ist an der Bereitstellung von Guanosin-diPhosphat-D-Mannose (GDP-D-Mannose) beteiligt, welches für die Biosynthese extrazellulärer Polysaccharide benötigt wird (Payton *et al.* 1991; Roux *et al.* 2004). Eine Abnahme des Gehalts an extrazellulär gebundenen Zuckerbestandteilen könnte die Zelloberflächenladung dahin gehend geändert haben, dass die Anlagerung polarer Verbindungen, wie Menadion, begünstigt wurde. In diesem Fall hätten Zellen der Insertionsmutante unter einem höheren Menadion-Stress gestanden als Zellen des WT, was wiederum zum beobachteten Menadion-sensitiveren Phänotyp führte. Daneben könnten in der *manA::TnSpc* Mutante Reparaturprozesse zur Beseitigung oxidierten extrazellulärer Polysaccharide durch Neusynthese dieser gestört sein. Auch in diesem Fall würde sich im Vergleich zum WT eine erhöhte Menadion-Sensitivität einstellen. Weiterführende Untersuchungen zur Bestimmung des Oberflächenpolysaccharidgehalts und der Oberflächenladung der *manA::TnSpc* Mutante könnten zur Klärung dieser Hypothesen beitragen.

In Serotyp M49 kam es durch Insertion des Transposonelements Tn*Spc* in *folC.2* zu einem Anstieg der Toleranz gegenüber H₂O₂ und Colistin. Das zu den Ligasen gehörende Enzym FolC übernimmt in Bakterien während der Folatbiosynthese oft zwei wesentliche Funktionen (Bognar *et al.* 1985). Zum einen fungiert es als Dihydrofolatsynthetase, indem es Glutamat an Dihydropteroat anfügt. Dihydrofolat ist ein Vorläufer von Tetrahydrofolat (THF), welches zur Synthese von organischen Basen (Purinen und Pyrimidinen), verschiedener Aminosäuren, Pantothenat sowie zur Initiation der Proteinbiosynthese verwendet wird. In seiner zweiten Funktion katalysiert FolC als Folylpolylglutamatsynthetase die Verknüpfung mehrerer Glutamatreste an THF, dadurch ändert sich die Spezifität von THF als Kofaktor oder Inhibitor Folat-abhängiger Enzyme und die Abgabe von Folat in den extrazellulären Raum wird verhindert (McGuire und Bertino 1981). Bei diesen essentiellen Funktionen von FolC ist es verwunderlich, dass eine *folC::TnSpc* Insertionsmutante von *S. pyogenes* vital war. Burghout

et al. (2013) war es jedoch ebenfalls gelungen, in *S. pneumoniae* nach Inaktivierung eines (*folC*) von insgesamt zwei (*sulB* und *folC*) homologen Genen für FolC vitale Zellen zu isolieren. Die Deletion des zweiten FolC-homologen Gens (*sulB*) blieb jedoch ohne Erfolg. Daraufhin postulierten Burghout *et al.* (2013), dass *sulB* in *S. pneumoniae* die eigentliche Funktion zur Synthese an lebensnotwendigem Folat einnimmt. Die Funktion des *folC* Genprodukts hingegen ist noch nicht ausreichend geklärt. Burghout *et al.* (2013) vermuten eine Beteiligung bei der Anpassung von *S. pneumoniae* an Nischenbedingungen während der Besiedlung im menschlichen Organismus, durch die Bereitstellung von ausreichend Folat. Ähnlich wie für *S. pneumoniae* enthält das Genom von *S. pyogenes* NZ131 zwei homologe Gene für FolC, *folC.1* (*Spy49_0851*) und *folC.2* (*Spy49_0638c*). Sehr wahrscheinlich übernimmt deshalb FolC.1 die eigentliche Funktion als Dihydrofolat-/Folylpolyglutamatsynthetase in der Folatbiosynthese. FolC.2 scheint dagegen eine andere Funktion zu haben. Welche diese sein könnte, muss in weiteren Experimenten geklärt werden. Aufgrund des beobachteten Phänotyps der *folC.2::TnSpc* Insertionsmutante, gesteigerte H₂O₂- und Colistin-Toleranz, wäre es denkbar, dass FolC.2 eine inhibitorische Rolle in der Folatbiosynthese einnimmt. Folat verhindert die Oxidation von DNA durch freie Radikale und ist an Reparaturmechanismen der DNA sowie an der DNA-Replikation beteiligt (Duthie *et al.* 2002).

Durch Sequenzierung der Transposoninsertionsstelle einer M18 *TnSpc*-Insertionsmutante mit einer zum WT erhöhten Menadion/H₂O₂-Sensitivität konnte *ruvB*, eine „Holliday junction“-DNA-Helikase, ermittelt werden. Darüber hinaus wurde als *TnSpc*-Insertionsstelle einer M49 Transposonmutante mit zum WT erhöhter Menadion/H₂O₂/Colistin-Sensitivität *recO*, kodierend für ein DNA-Reparaturprotein, identifiziert. Bei gramnegativen Organismen wurde bereits gezeigt, dass sowohl DNA-Reparatur-Proteine als auch Proteine zur Rekombination durch Entfernung und Neusynthese beschädigter DNA-Abschnitte zur Abwehr von oxidativem Stress einen wesentlichen Beitrag leisten. In *N. gonorrhoeae* führte die Inaktivierung von *recA*, des RecBCD Komplexes und RecF-verwandten Signalwegen, wozu neben RecJ und RecQ auch RecO gehört, zu einer Abnahme der H₂O₂-Resistenz (Stohl und Seifert 2006). Weiterhin waren RecG, RuvA, RuvB und RuvC, welche zur Prozessierung von „Holliday junction“-Strukturen entlang der DNA dienen, an rekombinatorischen DNA-Reparaturmechanismen beteiligt (Sechman *et al.* 2006; Sechman *et al.* 2005).

In Serotyp M18 wurde zusätzlich der Einbau von *TnSpc* in den Promotorbereich des Transkriptionsregulators *Mga* sowie in *mtsA*, ein Gen für ein Metallbindeprotein eines ABC-Transporters, nachgewiesen. Beide *TnSpc*-Insertionsmutanten zeichneten sich durch eine verstärkte Sensitivität gegenüber Menadion und Colistin aus, im Vergleich zum WT. *Mga* kontrolliert die Expression einer Vielzahl von oberflächenassoziierten Virulenzfaktoren, wie z. B. Proteine der M-Familie, C5a Peptidase, Serumopazitätsfaktor, Komplementinhibitor und ein Kollagen-ähnliches Protein (Caparon und Scott 1987; Simpson *et al.* 1990; Chen *et al.* 1993; Kihlberg *et al.* 1995; McLandborough und Cleary 1995; Lukomski *et al.* 2000; Rasmussen *et al.* 2000; Lukomski *et al.* 2001). Aber auch Transportproteine zum Import von Peptiden, kodiert durch das *opp*- und *dpp*-Operon, werden durch *Mga* positiv reguliert (Podbielski und Leonard 1998). Ein gestörter Peptidimport, infolge der Insertion von *TnSpc* in den kodierenden Bereich von *Mga*, kann zu metabolischen Veränderungen geführt haben, welcher sekundär den beobachteten Phänotyp auslöste. Warum in diesem Fall die Empfindlichkeit gegenüber H_2O_2 im Vergleich zum WT nicht beeinträchtigt wurde, bleibt zu klären. Denkbar wäre auch, dass eine gestörte Expression von *Mga*-regulierten oberflächenassoziierten Genprodukten die Ladung der Zellhülle veränderte. Die Anlagerung polarer Verbindungen, wie Menadion und Colistin könnte dadurch begünstigt worden sein, was letztendlich zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber diesen Substanzen führte.

Janulczyk *et al.* (2003) konnten in *S. pyogenes* bereits zeigen, dass der ABC Transporter *MtsABC* neben der Bereitstellung von Eisen, Zink und Mangan auch an der Detoxifizierung von ROS beteiligt ist. Durch Insertion von *TnSpc* in *mtsA* konnte in Serotyp M18 zusätzlich ein Anstieg in der Empfindlichkeit gegenüber dem polaren AMP Colistin induziert werden. Die Bereitstellung von Eisen, Zink u./o. Mangan scheint somit auch an Mechanismen zur Detoxifizierung oder Abwehr der polaren Verbindung Colistin beteiligt zu sein.

Die Insertion von *TnSpc* in ein Gen für ein hypothetisches Phagenprotein führte in M18 zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber Menadion und H_2O_2 . Wie bereits erwähnt leisten phagenkodierte Gene einen wichtige Beitrag zur Virulenz bei *S. pyogenes*, da viele Virulenzfaktoren von Phagen oder Phagen-verwandten Gensequenzen kodiert werden (Brussow *et al.* 2004). Die Toleranz von oxidativen Stress ist hier ein weiterer wichtiger Virulenzfaktor, welcher von einem hypothetischen Phagenprotein in M18 beeinflusst wird.

In Serotyp M49 ergab die Sequenzierung der *TnSpc*-Insertionsstellen auffallend viele Gene mit bis dahin unbekannter Funktion. In drei Stämmen mit einer zum WT verminderten

Sensitivität gegenüber Menadion konnte die Insertion von *TnSpc* innerhalb der Genregion *Spy49_1658c* nachgewiesen werden. Zusätzlich wurde in zwei weiteren Stämmen mit einer zum WT verminderten H₂O₂-Sensitivität als Transposoninsertionsstelle *Spy49_1651* identifiziert. Das gehäufte Auftreten dieser Insertionsmutanten lässt vermuten, dass diese Regionen eine wesentliche Rolle bei der Regulierung von Mechanismen zur Detoxifizierung von ROS einnehmen. Aufgrund fehlender Informationen zur Funktion von *Spy49_1658c* und *Spy49_1651* sind weitere Untersuchungen unbedingt notwendig, um zu verstehen, wie der Organismus es schafft, oxidative Aggressoren zu kompensieren. Aus zeitlichen Gründen konzentrierte man sich in dieser Arbeit ausschließlich auf die Funktionsaufklärung von *Spy49_1658c*.

4.4. Charakterisierung von *Spy49_1658c*

Um polare Effekte durch die Insertion von *TnSpc* innerhalb des kodierenden Bereichs von *Spy49_1658c* auszuschließen, wurde die isogene Deletionsmutante Δ *Spy49_1658c* generiert und in weiteren Experimenten näher charakterisiert.

Δ *Spy49_1658c* zeigte sowohl auf genomischer als auch auf Transkriptionsebene den vollständigen Verlust von *Spy49_1658c*. Die Transkription eines unmittelbar stromaufwärts befindlichen Gens, *Spy49_1659c*, wurde durch die Inaktivierung von *Spy49_1658c* nicht beeinflusst. Der auf Agarplatten mit ansteigenden Konz. an Menadion beobachtete Phänotyp, eine erhöhte Toleranz im Vergleich zum WT, beruhte somit ausschließlich auf den Funktionsverlust von *Spy49_1658*. In Flüssig-THY konnte mit vitalen Zellen der Deletionsmutante aus der exponentiellen Wachstumsphase ebenfalls ein Anstieg der Menadion-Toleranz festgestellt werden. Zusätzlich bleibt zu erwähnen, dass sich der Phänotyp von Δ *Spy49_1658c* auf Agarstressplatten mit dem Wachstumsverhalten der *Spy49_1658c::TnSpc* Stämme deckte.

Experimente zur signifikanten Hemmung des Vermehrungspotentials von mind. 50 % führten allerdings zu einer Reduktion der Menadion-Toleranz bei Δ *Spy49_1658c*. Die Diskrepanz zwischen dem hier beobachteten Phänotyp von Δ *Spy49_1658c* und dem Phänotyp aus den Agarstressversuchen bzw. Überlebensraten vitaler Kulturen unter Menadion-Stress beruhen vermutlich auf Unterschiede im Aufbau der einzelnen Experimente. Zur Induktion einer signifikanten Wachstumshemmung von mind. 50 % wurden Kulturen mit einer geringen Zelldichte unter Menadion-Stress über 12 Stunden herangezogen. Hier waren wenige Zellen

mit der Aufgabe konfrontiert ihren Stoffwechsel auf Reproduktion, d. h. der Synthese von Zellbestandteilen wie DNA, Bestandteile der Proteinbiosynthese, Zellmembran und Zellwandkomponenten umzustellen und oxidativen Stress, induziert von Menadion durch die Bildung von Superoxidanionen, zu kompensieren. Diese enorme Belastung kann insgesamt zu einer Schwächung der Vitalität beigetragen haben. Menadion-Agarplatten dagegen wurden mit hohen Zelldichten aus stationären Kulturen beimpft und zur Berechnung der Überlebensraten kamen exponentiell wachsende *S. pyogenes*-Kulturen zum Einsatz. Im Verlauf einer Infektion mit *S. pyogenes* erreicht der Organismus in den seltensten Fällen vergleichbar hohe Zelldichten, wie während der exponentiellen oder sogar stationären Wachstumsphase wie in *in vitro* Experimenten. Unter *in vivo* Bedingungen könnte demnach der Einfluss multipler Stressfaktoren, wie unterschiedliche Abwehrmechanismen des menschlichen Immunsystems und Aufrechterhaltung eines erhöhten Zellmetabolismus sowie Kompensation des Verlustes von *Spy49_1658c* zu einer insgesamt abgeschwächten Vitalität der Deletionsmutante $\Delta Spy49_1658c$ führen. Das Resultat wäre eine Reduktion der Virulenz von $\Delta Spy49_1658c$ im Vergleich zum WT.

4.4.1. *In-silico* Untersuchungen zur Funktionsaufklärung der Genregion *Spy49_1658c* bis *Spy49_1659c*

In-silico Analysen des Genproduktes von *Spy49_1658c* konnten ein Motiv für eine Aminosäurepermease mit vier Transmembran-Helices identifizieren. Permeasen sind am Import und Export einer Vielzahl an Verbindungen wie Nährstoffen, Metaboliten, Peptiden, Ionen, Toxinen und antimikrobiellen Substanzen beteiligt. Bei Transportern vom ABC-Typ wird der Permease-vermittelte Transport über den Verbrauch von ATP angetrieben (Ames und LeCar 1992; Higgins 1992). Am Import sind zusätzlich hochaffine membran-assoziierte Proteindomänen zur Bindung extrazellulärer Substanzen beteiligt, welche an die Permease-Domäne gekoppelt sind (Higgins 1992; Hoshino *et al.* 1992; van der Heide und Poolman 2002). Stromaufwärts von *Spy49_1658c* befindet sich jedoch nur das Gen *Spy49_1659c*, welches ebenfalls für ein Protein mit unbekannter Funktion kodiert. Neun Nukleotide trennen beide Gene voneinander. Die hier vorgenommenen Untersuchungen auf RNA-Ebene zeigten, dass beide Gene als polycistronische RNA transkribiert werden (s. Ergebnisse 3.5.). Aufgrund dieser Informationen ist es sehr wahrscheinlich, dass die Funktionen von *Spy49_1658c* und *Spy49_1659c* miteinander verknüpft sind. *In-silico* Untersuchungen zur Proteinfunktion von *Spy49_1659c* identifizierten ein N-Acetyl-Muramoyl-L-Alanin-Amidase-Motiv sowie ein N-terminales Signalpeptid und eine α/β -Faltung. Amidasen gehören zur Enzymfamilie der

Hydrolasen und katalysieren die Spaltung von Kohlenstoff-Stickstoff-Bindungen, welche keine Peptidbindungen sind. Im Falle eines ABC-Transporters hätte man aufgrund der Nähe zur Permease für Spy49_1659c eine Funktion als hochaffines extrazelluläres Bindeprotein vermuten können, doch die dafür ungewöhnliche Proteinfaltung und das Amidase-Motiv lassen eher eine andere Funktion vermuten. So ist die Amidase durch die hydrolytische Spaltung der Bindung zwischen N-Acetyl-Muraminsäure und L-Alanin am Abbau der bakteriellen Zellwand während der Zellteilung oder beim Einbau von Sekretionssystemen, Flagellen oder Pili beteiligt (Scheurwater *et al.* 2008). Durch das Fehlen eines Motivs für ein extrazelluläres Bindeprotein wird die Permease höchstwahrscheinlich nicht für den Import sondern für den Export genutzt (Higgins 1992). Die postulierte Amidasefunktion von Spy49_1658c und der vorhergesagte Aminosäureexport durch Spy49_1658c weisen darauf hin, dass die komplette Genregion für dynamische Umbauprozesse des Peptidoglykangerüsts durch den Einbau einer oder mehrerer exportierter Aminosäuren dienen könnte.

4.4.2. Physiologische Charakterisierung von *Spy49_1658c*

Ein Vergleich der Verbrauchsdaten an essentiellen und nicht-essentiellen Aminosäuren des WT und der *Spy49_1658c::TnSpc* Stämme 32H3, 68C8 und 90C11 diente zur Aufklärung, welche Aminosäure(n) von einem gestörten Transport betroffen war(en) und ob es sich um einen Import oder um einen Export handelte. Da dieses Experiment nur einmalig durchgeführt wurde, sind die daraus gezogenen Rückschlüsse statistisch nicht abgesichert.

Insgesamt wurden bei allen untersuchten Aminosäuren Unterschiede zwischen den Verbrauchsdaten des WT und der Transposonmutanten während des exponentiellen Wachstums deutlich, eine Ausnahme bildete *Spy49_1658c::TnSpc* 32H3. Dies könnte auf eine allgemeine Schwächung der Stoffwechselaktivität in den Mutantenstämmen hindeuten. Auf Fitness und Metabolismus übte dies jedoch keinen wesentlichen Einfluss aus, da die berechneten Wachstumsparameter μ und t_d sowie die Azidifizierungsraten der *TnSpc*-Stämme dem des WT entsprachen (s. Anhang unter 6.3.4.). Auffallend waren jedoch die Verbrauchsdaten der nicht-essentiellen Aminosäure Glutaminsäure. Im WT wurden während des exponentiellen Wachstums negative Verbrauchswerte ermittelt, welche bis zum Eintritt in die stationäre Wachstumsphase gegen den Wert 0 mM/mg Trockenmasse anstiegen. Dagegen schwankte der Glutaminsäureverbrauch in den *Spy49_1658c::TnSpc* Stämmen 68C8 und 90C11 stetig um 0 mM/mg Trockenmasse. Die negativen Werte des Glutaminsäure-Verbrauchs sprechen für einen Export im WT, welcher unmittelbar oder mittelbar durch Spy49_1658c erfolgt. Durch die Insertion des Transposonelements *TnSpc* in den kodierenden

Bereich von *Spy49_1658c* wurde dieser soweit reduziert, bis kaum oder kein Export an Glutaminsäure detektiert werden konnte. Glutaminsäure (in seiner nicht-kanonischen D-Konfiguration) ist ein Bestandteil von Peptidbrücken zwischen Peptidoglykanketten in der bakteriellen Zellwand. Bis jetzt ist aber nicht bekannt, dass Glutaminsäure während der Synthese oder des Abbaus der Zellwand in ungebundener Form im extrazellulären Raum zur Verfügung steht. Das wäre aber die Voraussetzung, um mittels HPLC-Analyse zur Bestimmung der Verbrauchsrate in den Kulturüberständen detektiert zu werden. Natürlich ist nicht auszuschließen, dass Umstrukturierungen des Peptidoglykangerüsts das Vorhandensein einzelner Aminosäuren erforderlich machen, doch sind diese bis jetzt nicht bekannt. Denkbar wäre auch die Beteiligung von nicht-kovalenten Wechselwirkungen zur Befestigung von Glutaminsäure in der Zellwand oder der Zellwandaußenseite von *S. pyogenes*.

Die Übereinstimmungen zwischen den Aminosäurenverbrauchsrate des WT und der Transposonmutante 32H3 beruhen vermutlich auf der Lokalisation von *TnSpc* am 3'-Ende des kodierenden Bereichs von *Spy49_1658c*. Innerhalb *Spy49_1658c*, Länge 111 Aminosäuren, ist das Aminosäure-Permease-Motiv von Position 37 bis 103 lokalisiert. Die Insertion des *TnSpc*-Elements erfolgte bei Position 92. Ein funktionsfähiger Transport vermittelt durch *Spy49_1658c* wäre demzufolge in der Transposonmutante 32H3 denkbar. Doch würde sich in diesem Fall der beobachtete Phänotyp aus den Selektionsdurchgängen, welcher dem der restlichen Transposonstämme 68C8 und 90C11 und $\Delta Spy49_1658c$ entsprach, nicht durch den Funktionsverlust von *Spy49_1658c* erklären lassen. Eine zum WT und den restlichen Mutantenstämmen signifikant erhöhte Wachstumsrate μ bzw. verringerte Verdopplungszeit t_d (s. Anhang 6.3.3.) von 32H3 könnte eine mögliche Ursache für das verstärkte Wachstum auf MS-Agarplatten sein. Untersuchungen auf Proteinebene sollten durchgeführt werden, um Aufschluss über die Funktionsfähigkeit von *Spy49_1658c* in den *TnSpc*-Insertionsmutanten zu bekommen. Darüber hinaus sind mehrere Wiederholungen des Experiments zur Ermittlung der Aminosäurenverbrauchsrate zur Bestätigung der hier gezeigten vorläufigen Ergebnisse zwingend erforderlich.

Die bakterielle Zellwand übernimmt eine Vielzahl von Funktionen. Sie sorgt für die benötigte Stabilität, um dem inneren Zelldruck entgegenzuwirken, und dient gleichzeitig als Barriere gegenüber osmotischen Stress (Schleifer und Kandler 1972). Zusätzlich fungiert sie auch als Plattform zur Verankerung einer Reihe von Oberflächenproteinen, welche bei pathogenen

Organismen einen wesentlichen Beitrag zur Virulenz leisten. So sind in *S. pyogenes* unter anderem das M-Protein, M-ähnliche Proteine, das Kollagen Typ I-Bindeprotein Cpa und das Fibrinogen-Bindeprotein SfbI für Adhärenz, Kolonisierung und Invasion an Haut- und Schleimhautzellen beteiligt (Åkesson et al. 1994; Kreikemeyer et al. 2005). Sollte Spy49_1658c zusammen mit Spy49_1659c an Umbauprozessen in der bakt. Zellwand beteiligt sein, könnten in der Mutante Δ Spy49_1658c Veränderungen in Struktur und Zusammensetzung der Zellwand auftreten, welche auch einen Einfluss auf Vitalität bzw. Fitness und Virulenz von *S. pyogenes* ausüben. Wachstumsexperimente in den Medien THY, CDM und DMEM+GlutaMAX™ zeigten jedoch, dass es keinen signifikanten Unterschiede in Wachstumsraten μ und Verdopplungszeiten t_d zwischen WT M49 und Δ Spy49_1658c gibt. Somit scheint die Zellwandstabilität durch den Verlust von Spy49_1658c nicht maßgeblich von der des WT-Stammes abzuweichen. Bleibt zu klären, ob eventuell die Virulenz von *S. pyogenes* durch Zellwandveränderungen in der Mutante beeinflusst wurde.

4.4.3. Veränderte Oberflächenhydrophobizität durch den Funktionsverlust von Spy49_1658c

Das Adhärenzverhalten und die Fähigkeit zur Kolonisierung lebender und künstlicher Oberflächen wird hauptsächlich durch die Polarität der bakterielle Außenhülle bestimmt (Doyle und Rosenberg 1990). In Gram-positiven Bakterien tragen Lipoteichonsäuren maßgeblich zur Hydrophobizität der Zelloberfläche bei (Doyle und Rosenberg 1990; Courtney et al. 1990; Fedtke et al. 2007; Miorner et al. 1983). Diese Glycerol-Phosphat-Polymere sind über einen amphiphilen Glycolipid-Anker kovalent in die Zellmembran eingebettet und durchdringen mit ihrer hydrophilen Polymer-Komponente kettenartig die Peptidoglykanschicht. Oberflächenproteine leisten ebenfalls einen wichtigen Beitrag zur Oberflächenhydrophobizität. Es konnte gezeigt werden, dass in verschiedenen Serotypen von *S. pyogenes* Oberflächenproteine mit Lipoteichonsäuren interagieren, wobei Fettsäuren, welche über eine Esterbindung mit Lipoteichonsäuren verknüpft sind, auf der Zelloberfläche von *S. pyogenes* exponiert werden (Ofek et al. 1983). Sowohl für Δ Spy49_1658c (s. Ergebnisse 3.9.) als auch für die Spy49_1658c::TnSpc Stämme 68C8 und 90C11 (s. Anhang 6.3.5.) konnte eine zum WT signifikant verringerte Hydrophobizität der Zelloberfläche mit Hilfe von n-Hexadecan nachgewiesen werden. Dies ist ein wichtiger Hinweis für Veränderungen in der Zellwandzusammensetzung bzw. für strukturelle Veränderungen einzelner Zellwandkomponenten. Zudem verändert eine geringere Oberflächenhydrophobizität die Affinität zu sowohl hydrophoben als auch zu polaren

Verbindungen. MS liegt in wässriger Lösung als negativ geladenes Menadionbisulfit-Ion vor. Oberflächen mit negativen Ladungseigenschaften würden eher zur Abstoßung von MS-Ionen führen. In diesem Fall könnten Abstoßungsreaktionen auch zu dem beobachteten Anstieg der MS-Toleranz in der *Spy49_1658c* Deletionsmutante und den Insertionsmutanten geführt haben. Ob neben einer verringerten Zelloberflächenhydrophobizität auch das Virulenzverhalten von *S. pyogenes* durch den Verlust von *Spy49_1658c* beeinflusst wurde, sollte in verschiedenen Virulenzversuchen genauer analysiert werden.

Ähnlich wie in den Versuchen zur Bestimmung der Aminosäurenverbrauchsraten, zeigte Insertionsmutante 32H3 eine zum WT nicht signifikant abweichende Hydrophobizität der Zelloberfläche. Ein durch die Insertion von *TnSpc* am 3'-Ende verkürztes aber funktionsfähiges Protein von *Spy49_1658c* wäre auch hier eine denkbare Erklärung für die beobachtete Übereinstimmung von WT und *Spy49_1658c::TnSpc* 32H3.

4.4.4. Einfluss von *Spy49_1658c* auf die Virulenz von *S. pyogenes* M49 *in vitro*

Im Versuch zum Adhärenz- und Internalisierungsverhalten von *S. pyogenes* an humane Keratinozyten HaCaT konnte für Δ *Spy49_1658c* ein zum WT signifikant verringertes Adhärenzvermögen beobachtet werden. Auf die Internalisierungsrate hatte der Verlust von *Spy49_1658c* keine Auswirkung. Eine Ursache für die verminderte Adhärenzrate der Deletionsmutante wäre die beobachtete Reduktion der Oberflächenhydrophobizität. Jedoch auch Veränderungen von zellwandassoziierten Proteinstrukturen können für Adhärenzraten von lediglich 25 % der WT-Adhärenzwerte verantwortlich sein. Hasty *et al.* (1992) beschrieben ein Adhärenz-Modell für GAS, bestehend aus zwei Schritten, indem zu Beginn hydrophobe Wechselwirkungen für eine lockere Anheftung und nachfolgend Oberflächenproteine, sogenannte Adhäsine, für eine stabile Anlagerung an Wirtszellrezeptoren sorgen (Nobbs *et al.* 2009). Zu den Adhäsinen zählen unter anderem auch M-Proteine. M-Proteine und Mitglieder der M-Proteinfamilie können mit LTA interagieren und so die Oberflächenhydrophobizität und Adhäsion von GAS maßgeblich beeinflussen (Courtney *et al.* 2009). Daneben konnte für GAS M1T1 gezeigt werden, dass Pili bei der Adhärenz an humane Keratinozyten eine wichtige Rolle spielen (Abbot *et al.* 2007). Durch den Verlust von *Spy49_1658c* könnte es zu Veränderungen im Adhäsinanteil selbst oder in ihrer Zugänglichkeit innerhalb der Zellwand gekommen sein, was sowohl die Oberflächenhydrophobizität als auch das Adhärenzverhalten beeinflusste.

In Versuchen mit menschlichem Vollblut verfügte $\Delta Spy49_1658c$ über ein signifikant verringertes Reproduktionspotential als der WT. Mehrere Studien belegten, dass bakterielle oberflächenassoziierte Proteine zur Umgehung der Komplementaktivierung beitragen und damit eine invasive Ausbreitung des Organismus durch höhere Überlebensraten im menschlichen Vollblut gewährleisten (Lambris *et al.* 2008; Rooijakkers und van Strijp 2007; Serruto *et al.* 2010). In GAS sind unter anderem, die zu den Adhäsinen zugeordneten Fn-Bindeproteine und M Proteine an der Komplementdeaktivierung beteiligt. Fisher *et al.* (2008) und Dahesh *et al.* (2012) konnten belegen, dass das Oberflächenprotein Shr zur Bindung an die extrazellulären Matrixproteine Laminin u./o. Fibronektion sowie zur Bindung von Hemoproteinen dient. Somit leistet ein weiteres Mitglied der Adhäsinfamilie durch die Bereitstellung von Eisen einen wichtigen Beitrag zum Überleben im menschlichen Vollblut. Die signifikant geringeren Vermehrungsraten der $Spy49_1658c$ Deletionsmutante könnten demnach ein weiterer Beleg für Veränderungen im zellwandassoziierten Proteinanteil darstellen.

Ähnlich wie für die Internalisierungsraten, unterschied sich der Anteil nicht-adhärenter, im Zellkulturüberstand befindlicher, GAS-Zellen im Versuch mit humanen HaCaT Keratinozyten zwischen WT und $\Delta Spy49_1658c$ nicht voneinander. Unter Einbeziehung der mathematischen Differenz aus der Summe im Überstand, adhärent an und internalisiert in HaCaT befindlicher GAS-Zellen zur Gesamtzellzahl, wurden jedoch signifikante Unterschiede zwischen WT und $\Delta Spy49_1658c$ deutlich. In der Deletionsmutante war aufgrund der geringen Adhärenzrate dieser Anteil signifikant höher als im WT. Eine erhöhte Abtötungsrate oder verstärkte Wachstumshemmung während der Kokultivierung von $\Delta Spy49_1658c$ und HaCaT könnten mögliche Gründe für diese Beobachtung sein. Durch die Produktion verschiedener AMPs, wie Defensine und Cathelicidine, besitzen auch Keratinozyten antimikrobielle Eigenschaften (Lai und Gallo 2009; Yamasaki und Gallo 2008; Braff und Gallo 2006). Und wie der Versuch zur Induktion einer signifikanten Wachstumshemmung von mind. 50 % zeigte, konnte durch Verwendung des Cathelicidins LL-37 und des AMP Protamin ein abgeschwächtes Vermehrungspotential in der Deletionsmutante induziert werden.

Als ein Bestandteil der angeborenen Immunantwort leisten Phagozyten (Makrophagen und PMNs) einen wichtigen Beitrag zur Bekämpfung und Eliminierung eingedrungener Organismen, wie Viren, Bakterien und Pilze. Dabei kommen sowohl ROS (NO , OH^\cdot , O_2^\cdot ,

Hypochlorid) als auch AMPs zur Abtötung phagozytierter Organismen zum Einsatz. Im Versuch mit murinen Monozyten/Makrophagen wurden vom WT als auch von $\Delta Spy49_1658c$ knapp die Hälfte der eingesetzten Gesamtmenge nach 30 Minuten getötet. Die Deletionsmutante besaß zwar ein erhöhtes Toleranzpotential gegenüber dem $O_2^{\cdot -}$ -Produzenten MS, jedoch gegenüber des OH^{\cdot} -Bildners H_2O_2 war die Sensitivität nicht vom WT verschieden. Das Zusammenwirken verschiedener oxidativer Stressoren und AMPs stellt einen höchst effektiven Abwehrmechanismus des Wirtes dar, wogegen das verwendete GAS Hautisolat M49 591 auch durch den Verlust von $Spy49_1658c$ nichts entgegenzusetzen hatte.

5. Literatur

Abbot E. L., Smith W. D. , Siou G. P., Chiriboga C., Smith R. J., Wilson J. A. *et al.* (2007): Pili mediate specific adhesion of *Streptococcus pyogenes* to human tonsil and skin. *Cellular Microbiology* 9: 1822-1833

Abtin A., Jain R., Mitchell A. J., Roediger B., Brzoska A. J., Tikoo S. *et al.* (2014): Perivascular macrophages mediate neutrophil recruitment during bacterial skin infection. *Nature Immunology* 15 (1): 45-53

Åkesson P., Schmidt K. H., Cooney J., Björck L. (1994): M1 protein and protein H: IgGFC- and albumin-binding streptococcal surface proteins encoded by adjacent genes. *The Biochemical Journal* 300 (3): 877-886

Alwine J. C., Kemp D. J., Stark G. R. (1977): Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 75: 5350-5353

Ames G. F.-L. and H. LeCar (1992): ATP-dependent bacterial transporters and cystic fibrosis: analogy between channels and transporters. *FASEB Journal* 6: 2660-2666

Au N., Kuester-Schoeck E., Mandava V., Bothwell L. E., Canny S. P., Chachu K. *et al.* (2005): Genetic composition of the *Bacillus subtilis* SOS system. *Journal of Bacteriology* 187: 7655-7666

Babior B. M. (1991): The respiratory burst oxidase and the molecular basis of chronic granulomatous disease. *American Journal of Hematology* 37: 263-266

Bae Y. S., Lee J. H., Choi S. H. Kim S., Almazan F., Witztum J. L., Miller Y. I. (2009): Macrophages generate reactive oxygen species in response to minimally oxidized low-density lipoprotein: toll-like receptor 4- and spleen tyrosine kinase-dependent activation of NADPH oxidase 2. *Circulation Research* 104 (210-218): 221

Bernard J. J. and Gallo R. L. (2011): Protecting the boundary: the sentinel role of host defense peptides in the skin. *Cellular and Molecular Life Sciences* 68: 2189 -2199

Berggard K., Johnsson E., Morfeldt E., Persson J., Stalhammar-Carlemalm M., Lindahl G. (2001): Binding of human C4BP to the hypervariable region of M protein: a molecular mechanism of phagocytosis resistance in *Streptococcus pyogenes*. *Molecular Microbiology* 42: 539-51

Birnboim H. C. and Doly J. (1979): A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research* 7: 1513-1523

Bognar A. L., Osborne C., Shane B., Singer S. C., Ferone R. (1985): Folylpolgamma-glutamate synthase-dihydrofolate synthase. Cloning and high expression of the *Escherichia coli folC* gene and purification and properties of the gene product. *The Journal of Biological Chemistry* 260: 5625-5630

Boukamp P., Dzarlieva-Petrusevska R. T., Breitkreuz D., Hornung J., Markham A., Fusenig N. E. (1988): Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *The Journal of Cell Biology* 106: 761-771

Braff M. H. and Gallo R. L. (2006): Antimicrobial peptides: an essential component of the skin defensive barrier. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 306: 91–110

Brenot A., King K. Y., Caparon M. G. (2005): The PerR regulon in peroxide resistance and virulence of *Streptococcus pyogenes*. *Molecular Microbiology* 55: 221–234

Brenot A., Weston B. F., Caparon M. G. (2007): A PerR-regulated metal transporter (PmtA) is an interface between oxidative stress and metal homeostasis in *Streptococcus pyogenes*. *Molecular Microbiology* 63: 1185–1196

Brinkmann V., Reichard U., Goosmann C., Fauler B., Uhlemann Y., Weiss D. S., Weinrauch Y., Zychlinsky A. (2004): Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 303: 1532-1535

Brisno A. L., Brito M. O., Collins C. M. (2003): Molecular basis of group A streptococcal virulence. *The Lancet Infectious Diseases* 3: 191–200

Brogden K. A. (2005): Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature Review Microbiology* 3: 238–250

Brotz H., Bierbaum G., Leopold K., Reynolds P. E., Sahl H. G. (1998): The lantibiotic mersacidin inhibits peptidoglycan synthesis by targeting lipid II. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 42: 154–160

Brussow H., Canchaya C., Hardt W. D. (2004): Phages and the evolution of bacterial pathogens: from genomic rearrangements to lysogenic conversion. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 68: 560–602

Burghout P., Zomer A. L., van der Gaast-de Jongh C. E., Janssen-Megens E. M., François K.-J., Stunnenberg H. G., *et al.* (2013): *Streptococcus pneumoniae* folate biosynthesis responds to environmental CO₂ levels. *Journal of Bacteriology* 195: 1573–1582

Byrne M. E., Rouch D. A., Skurray R. A. (1989): Nucleotide sequence analysis of IS256 from the *Staphylococcus aureus* gentamicin-tobramycin-kanamycin-resistance transposon Tn4001. *Gene* 81: 361–367

Caparon M. G. and Scott J. R. (1987): Identification of a gene that regulates expression of M protein, the major virulence determinant of group A streptococci. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 84: 8677-8681

Caparon M. G. and Scott J. R. (1991): Genetic manipulation of pathogenic streptococci. *Methods in Enzymology* 204: 556–86

Carapetis J. R., Steer A. C., Mulholland E. K., Weber M. (2005): The global burden of group A streptococcal diseases. *The Lancet Infectious Diseases* 5: 685–694

Cabiscol E., Tamarit J., Ros J. (2000): Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. *International Microbiology* 3: 3–8

Chaussee M. S., Liu J., Stevens D. L., Ferretti J. J. (1996): Genetic and phenotypic diversity among isolates of *Streptococcus pyogenes* from invasive infection. *The Journal of Infectious Diseases* 173: 901–908

Chen C., Bormann N., Cleary P. P. (1993): VirR and Mry are homologous trans-acting regulators of M protein and C5a peptidase expression in group A streptococci. *Molecular and General Genetics* 241: 685–693

Chen G.Y. and Nunez G. (2010): Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nature Reviews Immunology* 10: 826–837

Courtney H. S., Hasty D. L., Ofek I. (1990): Hydrophobicity of group A streptococci and its relationship to adhesion of streptococci to host cells. In: Doyle RJ, Rosenberg M, eds *Microbial Cell Surface Hydrophobicity*. American Society for Microbiology: 361–386

Courtney H. S., Liu S., Dale J. B., Hasty D. L. (1997): Conversion of M serotype 24 of *Streptococcus pyogenes* to M serotypes 5 and 18: effect on resistance to phagocytosis and adhesion to host cells. *Infection and Immunity* 65: 2472–74

Courtney H. S., Ofek I., Penfound T., Nizet V., Pence M. A., Kreikemeyer B., Podbielski A., Hasty D. L., Dale J. B. (2009): Relationship between expression of the family of M proteins and lipoteichoic acid to hydrophobicity and biofilm formation in *Streptococcus pyogenes*. *PLoS ONE* 4 (1): e4166

Cue D., Dombek P. E., Lam H., Cleary P. P. (1998): *Streptococcus pyogenes* serotype M1 encodes multiple pathways for entry into human epithelial cells. *Infection and Immunity* 66: 4593–601

Cunningham M. W. (2000): Pathogenesis of group A streptococcal infections. *Clinical Microbiology Reviews* 13: 470–511

Daher K. A., Selsted M. E., Lehrer R. I. (1986): Direct inactivation of viruses by human granulocyte defensins. *Journal of Virology* 60: 1068–1074

Dahesh S., Nizet V., Cole J. N. (2012): Study of streptococcal hemoprotein receptor (Shr) in iron acquisition and virulence of M1T1 group A streptococcus. *Virulence* 3: 564–573

Daly M. J., Gaidamakova E. K., Matrosova V. Y., Vasilenko A., Zhai M., Venkateswaran A., et al. (2004): Accumulation of Mn(II) in *Deinococcus radiodurans* facilitates gamma-radiation resistance. *Science* 306: 1025–1028

De Y., Chen Q., Schmidt A. P., Anderson G. M., Wang J. M., Wooters J., Oppenheim J. J., Chertov O. (2000): LL-37, the neutrophil granule- and epithelial cell-derived cathelicidin, utilizes formyl peptide receptor-like 1 (FPR1) as a receptor to chemoattract human peripheral blood neutrophils, monocytes, and T cells. *The Journal of Experimental Medicine* 192: 1069–1074

DeCoursey T. E. and Ligeti E. (2005): Regulation and termination of NADPH oxidase activity. *Cellular and Molecular Life Sciences* 62: 2173–2193

Doyle R. J. and Rosenberg M. (1990): *Microbial Cell Surface Hydrophobicity*. Washington DC: American Society for Microbiology: 425 p

Durr U. H., Sudheendra U. S., Ramamoorthy A. (2006): LL-37, the only human member of the cathelicidin family of antimicrobial peptides. *Biochimica et Biophysica Acta* 1758: 1408–1425

Duthie S. J., Narayanan S., Brand G. M., Pirie L., Grant G. (2002): Impact of folate deficiency on DNA stability. *The Journal of Nutrition* 132: 2444S–2449S

Facklam R. and Edwards L. R. (1979): A reference laboratory's investigations of proposed M-type strains of *Streptococcus pyogenes*, capsular types of *S. agalactiae*, and new group antigens of streptococci. In: Parker M. T., ed. *Pathogenic streptococci. Proceedings of the VII International Symposium on Streptococci and Streptococcal Diseases* (Oxford, England). Chertsey, Surrey, England: Reedbooks :251–253

Facklam R., Beall B., Efstratiou A., Fischetti V., Johnson D., Kaplan E., Kriz P., et al. (1999): Emm typing and validation of provisional M types for group A streptococci. *Emerging Infectious Diseases* 5: 247–253

Facklam R. F., Martin D. R., Lovgren M., Johnson D. R., Efstratiou A., Thompson T. A., et al. (2002): Extension of the Lancefield classification for group A streptococci by addition of 22 new M protein gene sequence types from clinical isolates: emm103 to emm124. *Clinical Infectious Diseases* 34: 28–38

Fedtke I., Mader D., Kohler T., Moll H., Nicholson G., et al. (2007): A *Staphylococcus aureus* *ypfP* mutant with strongly reduced lipoteichoic acid (LTA) content: LTA governs bacterial surface properties and autolysin activity. *Molecular Microbiology* 65: 1078–1091

Ferreira B. T., Benchetrit L. C., De Castro A. C., Batista T. G., Barrucand L. (1992): Extracellular deoxyribonucleases of streptococci: a comparison of their occurrence and levels of production among beta-hemolytic strains of various serological groups. *Zentralbibliothek Bakteriologie* 277: 493–503

Fiedler T., Sugareva V., Patenge N., Kreikemeyer B. (2010): Insights into *Streptococcus pyogenes* pathogenesis from transcriptome studies. *Future Microbiology* 5:1675–1694

Fischetti V. A. (1989): Streptococcal M protein: molecular design and biological behavior. *Clinical Microbiology Reviews* 2: 285–314

Fisher M., Huang Y. S., Li X., McIver K. S., Toukoki C., Eichenbaum Z. (2008): Shr is a broad-spectrum surface receptor that contributes to adherence and virulence in group A streptococcus. *Infection and Immunity* 76: 5006-5015

Gaballa A. and Helmann J. D. (2002): A peroxide-induced zinc uptake system plays an important role in protection against oxidative stress in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology* 45: 997–1005

- Gallo R. L. and Huttner K. M. (1998):** Antimicrobial peptides: an emerging concept in cutaneous biology. *The Journal of Investigative Dermatology* 111: 739–743
- Gallo R. L., Murakami M., Ohtake T., Zaiou M. (2002):** Biology and clinical relevance of naturally occurring antimicrobial peptides. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 110: 823–831
- Grange P. A., Chéreau C., Raingeaud J., Nicco C., Weill B., Dupin N., Batteux F. (2009):** Production of superoxide anions by keratinocytes initiates *P. acnes*-induced inflammation of the skin. *PLoS Pathogens* 5 (7): e1000527
- Gibson C. M., Mallet C., Clairborne A., Caparon M. G. (2000):** The contribution of NADH oxidase to the aerobic metabolism of *Streptococcus pyogenes*. *Journal of Bacteriology* 182: 448–455
- Gibson C. M., Caparon M. G. (2002):** Alkaline phosphatase reporter transposon for identification of genes encoding secreted proteins in gram-positive microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 928–932
- Hahn T. W., Mothershed E. A., Waldo R. H. III, Krause D. C. (1999):** Construction and analysis of a modified Tn4001 conferring chloramphenicol resistance in *Mycoplasma pneumoniae*. *Plasmid* 41:120–124
- Halliwell B. and Gutteridge J. M. C. (1999):** Free radicals in biology and medicine (3rd ed.). Oxford University Press
- Hampton M. B., Winterbourn C. C. (1999):** Methods for quantifying phagocytosis and bacterial killing by human neutrophils. *Journal of Immunological Methods* 232: 15-22
- Hanski E., Horwitz P. A., Caparon M. G. (1992):** Expression of protein F, the fibronectin-binding protein of *Streptococcus pyogenes* JRS4, in heterologous streptococcal and enterococcal strains promotes their adherence to respiratory epithelial cells. *Infection and Immunity* 60: 5119–5125
- Hasty D. L., Ofek I., Courtney H. S., Doyle R. J. (1992):** Multiple adhesins of streptococci. *Infection and Immunity* 60: 2147–2152
- Herbig A. F. and Helmann J. D. (2001):** Roles of metal ions and hydrogen peroxide in modulating the interaction of the *Bacillus subtilis* PerR peroxide regulon repressor with operator DNA. *Molecular Microbiology* 41: 849–859
- Higgins C. F. (1992):** ABC transporters: from microorganisms to man. *Annual Review of Cell Biology* 8: 67-113
- Hoe N. P., Nakashima K., Lukomski S., Grigby D., Liu M., Kordari P., Dou S., et al. (1999):** Rapid selection of complement-inhibiting protein variants in group A *Streptococcus* epidemic waves. *Nature Medicine* 5: 924–929
- Hondorp E. R. and McIver K. S. (2007):** The Mga virulence regulon: infection where the grass is greener. *Molecular Microbiology* 66: 1056 –1065

Hoshino T., Kose-Terai K., Sato K. (1992): Solubilization and reconstitution of the *Pseudomonas aeruginosa* high affinity branched-chain amino acid transport system. The Journal of Biological Chemistry 267: 21313-21318

Hytonen J., Haataja S., Isomaki P. and Finne J. (2000): Identification of a novel glycoprotein-binding activity in *Streptococcus pyogenes* regulated by the *mga* gene. Microbiology 146: 31-39

Ichikawa S., Miyake M, Fujii R., Konishi Y. (2012): MyD88 associated ROS generation is crucial for *Lactobacillus* induced IL-12 production in macrophage. PLoS One 7: e35880

Janeway C. A., Travers P., Walport M. and Shlomchik M. J. (2001): Immunobiology (Book): The immune system in health and disease. New York: Garland Science.

Janeway C. A. Jr. and Medzhitov R. (2002): Innate immune recognition. Annual Review of Immunology 20: 197–216

Janulczyk R., Ricci S., Björck L. (2003): MtsABC is important for manganese and iron transport, oxidative stress resistance, and virulence of *Streptococcus pyogenes*. Infection and Immunity 71: 2656–2664

Jenssen H., Hamill P., Hancock R. E. (2006): Peptide antimicrobial agents. Clinical Microbiology Reviews 19: 491–511

Ji Y., Schnitzler N., DeMaster E., Cleary P. (1998): Impact of M49, Mrp, Enn, and C5a peptidase proteins on colonization of the mouse oral mucosa by *Streptococcus pyogenes*. Infection and Immunity 66: 5399–405

Johnsson E., Berggard K., Kotarsky H., Hellwage J., Zipfel P. F., Sjöbring U., *et al.* (1998): Role of the hypervariable region in streptococcal M proteins: binding of a human complement inhibitor. The Journal of Immunology 161: 4894–4901

Kihlberg B. M., Cooney J., Caparon M. G., Olsen A., Björck L. (1995): Biological properties of a *Streptococcus pyogenes* mutant generated by Tn916 insertion in *mga*. Microbial Pathogenesis 19: 299-315

King K. Y., Horenstein J. A., Caparon M. G. (2000): Aerotolerance and peroxide resistance in peroxidase and PerR mutants of *Streptococcus pyogenes*. Journal of Bacteriology 182: 5290–5299

Koczulla A. R. and Bals R. (2003): Antimicrobial peptides: current status and therapeutic potential. Drugs 63: 389–406

Kreikemeyer B., McIver K. S., Podbielski A. (2003): Virulence factor regulation and regulatory networks in *Streptococcus pyogenes* and their impact on pathogen-host interactions. Trends in Microbiology 11: 224 –232

Kreikemeyer B., Klenk M., Podbielski A. (2004): The intracellular status of *Streptococcus pyogenes*: role of extracellular matrix-binding proteins and their regulation. International Journal of Medical Microbiology 294: 177–188

- Kreikemeyer B., Nakata M., Oehmcke S., Gschwendtner C., Normann J., et al. (2005):** *Streptococcus pyogenes* collagen type I-binding Cpa surface protein. Expression profile, binding characteristics, biological functions, and potential clinical impact. The Journal of Biological Chemistry 280: 33228–33239
- Kushner S. R. (1978):** An improved method for transformation of *Escherichia coli* with ColE1-derived plasmid. Genetic Engineering, Boyer, H. W., Nicosia S., eds., Elsevier/North-Holland Biomedical Press: 17-23
- Lai Y. and Gallo R. L. (2009):** AMPed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense. Trends in Immunology 30: 131–141
- Lai Y., Cogen A. L., Radek K. A., Park H. J., Macleod D. T., Leichtle A., Ryan A. F., DiNardo A., Gallo R. L. (2010):** Activation of TLR2 by a small molecule produced by *Staphylococcus epidermidis* increases antimicrobial defense against bacterial skin infections. The Journal of Investigative Dermatology 130: 2211-2221
- Lambris J. D., Ricklin D., Geisbrecht B. V. (2008):** Complement evasion by human pathogens. Nature Reviews. Microbiology 6 (2): 132–142
- Lancefield R. C. (1928):** The antigenic complex of *Streptococcus haemolyticus*. I. Demonstration of a type-specific substance in extracts of *Streptococcus haemolyticus*. The Journal of Experimental Medicine 47: 91–103
- LeBlanc D. L., Lee L. N., Inamine J. M. (1991):** Cloning and nucleotide base sequence analysis of a spectinomycin adenyltransferase AAD (9) determinant from *Enterococcus faecalis*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 35: 1804-1810
- Lin J. J. and Sancar A. (1989):** A new mechanism for repairing oxidative damage to DNA: (A)BC excinuclease removes AP sites and thymine glycols from DNA. Biochemistry 28: 7979 –7984
- Little J. W. and Mount D. W. (1982):** The SOS regulatory system of *Escherichia coli*. Cell 29: 11–22
- Lunsford R. D. (1995):** A Tn4001 delivery system for *Streptococcus gordonii* (Challis). Plasmid 33: 153–157
- Lukomski S., Nakashima K., Abdi I., Cipriano V. J., Ireland R. M., Reid S. D., Adams G. G., Musser J. M. (2000):** Identification and characterization of the *scl* gene encoding a group A streptococcus extracellular protein virulence factor with similarity to human collagen. Infection and Immunity 68: 6542-6553
- Lukomski S., Nakashima K., Abdi I., Cipriano V. J., Shelvin B. J., Graviss E. A., Musser J. M. (2001):** Identification and characterization of a second extracellular collagen-like protein made by group A streptococcus: control of production at the level of translation. Infection and Immunity 69: 1729-1738
- Lyon B. R., Gillespie M. T., Skurray R. A. (1987):** Detection and characterization of IS 256, an insertion sequence in *Staphylococcus aureus*. Journal of General Microbiology 133: 3031–3038

- Lyon W. R., Gibson C. M., Caparon M. G. (1998):** A role of Trigger Factor and an *Rgg*-like regulator in the transcription, secretion and processing of the cysteine proteinase of *Streptococcus pyogenes*. *EMBO Journal* 17: 6263-6275
- Maki H. and Sekiguchi M. (1992):** MutT protein specifically hydrolyses a potent mutagenic substrate for DNA synthesis. *Nature* 355: 273–275
- Martin N. J., Kaplan E. L., Gerber M. A., Menegus M. A., Randolph M., Bell K., Cleary P. P. (1990):** Comparison of epidemic and endemic group G streptococci by restriction enzyme analysis. *Journal of Clinical Microbiology* 28: 1881-1886
- McGuire J. J. and Bertino J. R. (1981):** Enzymatic synthesis and function of folylpolyglutamates. *Molecular and Cellular Biochemistry* 38 Spec No: 19–48
- McLandsborough L. A. and Cleary P. P. (1995):** Insertional inactivation of *virR* in *Streptococcus pyogenes* M49 demonstrates that VirR functions as a positive regulator of ScpA, FcRA, OF, and M protein. *FEMS Microbiology Letters* 128: 45-51
- McShan W. M., Ferretti J. J., Karasawa T., Suvorov A. N., Lin S., Qin B., Jia H., et al. (2008):** Genome sequence of a nephritogenic and highly transformable M49 strain of *Streptococcus pyogenes*. *Journal of Bacteriology* 190: 7773–7785
- Michaels M. L., Cruz C., Grollman A. P., Miller J. H. (1992):** Evidence that MutY and MutM combine to prevent mutations by an oxidatively damaged form of guanine in DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 89: 7022–7025
- Miorner H., Johansson G., Kronvall G. (1983):** Lipoteichoic acid is the major cell wall component responsible for surface hydrophobicity of group A streptococci. *Infection and Immunity* 39: 336–343
- Mittal C. K. and Murad F. (1977):** Activation of guanylate cyclase by superoxide-dismutase and hydroxyl radical—Physiological regulator of guanosine 3,5-monophosphate formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 74: 4360–4364
- Miyoshi-Akiyama T., Takamatsu D., Koyanagi M., Zhao J., Imanishi K., et al. (2005):** Cytocidal effect of *Streptococcus pyogenes* on mouse neutrophils in vivo and the critical role of streptolysin S. *The Journal of Infectious Diseases* 192: 107–116
- Mongkolsuk S. and Helmann J. D. (2002):** Regulation of inducible peroxide stress responses. *Molecular Microbiology* 45: 9–15
- Moody M. D. (1967):** Minutes of meeting held in Moscow of the International Committee on Nomenclature of Bacteria Subcommittee on Streptococci and Pneumococci. *International Journal of Systematic Bacteriology* 17: 281–314
- Moore C.M. and Helmann J.D. (2005):** Metal ion homeostasis in *Bacillus subtilis*. *Current Opinion in Microbiology* 8: 188–195

Moore C.M., Gaballa A., Hui M., Ye R.W. and Helmann, J.D. (2005): Genetic and physiological responses of *Bacillus subtilis* to metal ion stress. *Molecular Microbiology* 57: 27–40

Musser J. M., Hauser A. R., Kim M. H., Schlievert P. M., Nelson K. and Selander R. K. (1991): *Streptococcus pyogenes* causing toxic-shock like syndrom and other invasive diseases: clonal diversity and pyrogenic exotoxin expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 88: 2668–2672

Nakata M., Köller T., Moritz K., Ribardo D., Jonas L., McIver K. S., Sumitomo T., Terao Y., Kawabata S., Podbielski A., Kreikemeyer B. (2009): Mode of expression and functional characterization of FCT-3 pilus region encoded proteins in the *Streptococcus pyogenes* serotype M49. *Infection and Immunity* 77: 32–44

Nelson D., Schuch R., Chahales P., Zhu S., Fischetti V. A. (2006): PlyC: A multimeric bacteriophage lysin. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 103: 10765–10770

Niyonsaba F., Iwabuchi K., Matsuda H., Ogawa H., Nagaoka I. (2002): Epithelial cell-derived human beta-defensin-2 acts as a chemotaxin for mast cells through a pertussis toxin-sensitive and phospholipase C-dependent pathway. *International Immunology* 14: 421–426

Niyonsaba F., Ogawa H., Nagaoka I. (2004): Human beta-defensin-2 functions as a chemotactic agent for tumour necrosis factor-alpha-treated human neutrophils. *Immunology* 111 (3): 273–281

Nobbs A. H., Lamont R. J., Jenkinson H. F. (2009): *Streptococcus* adherence and colonization. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 73: 407–450

O'Brien K. L., Beall B., Barrett N. L., et al. (2002): Epidemiology of invasive group A streptococcus disease in the United States, 1995–1999. *Clinical Infectious Diseases* 35: 268–276

Ofek I., Whitnack E., Beachey E. H. (1983): Hydrophobic interactions of group A streptococci with hexadecane droplets. *Journal of Bacteriology* 154: 139–145

Okada N., Pentland A. P., Falk P., Caparon M. G. (1994): M protein and protein F act as important determinants of cell-specific tropism of *Streptococcus pyogenes* in skin tissue. *The Journal of Clinical Investigation* 94: 965–977

Okada N., Liszewski M. K., Atkinson J. P., Caparon M. (1995): Membrane cofactor protein (CD46) is a keratinocyte receptor for the M protein of the group A streptococcus. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 92: 2489–2493

Outten F. W., Djaman O., Storz G. (2004): A *suf* operon requirement for Fe-S cluster assembly during iron starvation in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* 52: 861–872

Ozeri V., Rosenshine I., Mosher D. F., Fassler R., Hanski E. (1998): Roles of integrins and fibronectin in the entry of *Streptococcus pyogenes* into cells via protein F1. *Molecular Microbiology* 30: 625–637

- Payton M. A., Rheinacker M., Klig L. S., DeTiani M., Bowden E. (1991):** A novel *Saccharomyces cerevisiae* secretory mutant possesses a thermolabile phosphomannose isomerase. *Journal of Bacteriology* 173: 2006-2010
- Pivarsci A., Kemény L., Dobozy A. (2004):** Innate immune functions of the keratinocytes: a review. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* 51: 303–310
- Podbielski A., Schnitzler N., Beyhs P., Boyle M. D. P. (1996a):** M-related protein (Mrp) contributes to group A streptococcal resistance to phagocytosis by human granulocytes. *Molecular Microbiology* 19: 429–441
- Podbielski A., Spellerberg B., Woischnik M., Pohl B., Lutticken R. (1996b):** Novel series of plasmid vectors for gene inactivation and expression analysis in group A streptococci (GAS). *Gene* 177: 137-147
- Podbielski A., Leonard B. A. (1998):** The group A streptococcal dipeptide permease (Dpp) is involved in the uptake of essential amino acids and affects the expression of cysteine protease. *Molecular Microbiology* 28: 1323-1334
- Ralph P., Moore M. A., Nilsson K. (1976):** Lysozyme synthesis by established human and murine histiocytic lymphoma cell lines. *The Journal of Experimental Medicine* 143: 1528–1533
- Rasmussen, M., Eden A., Björck L. (2000):** SclA, a novel collagen-like surface protein of *Streptococcus pyogenes*. *Infection and Immunity* 68: 6370-6377
- Ricci S., Janulczyk R., Björck, L. (2002):** The regulator PerR is involved in oxidative stress response and iron homeostasis and is necessary for full virulence of *Streptococcus pyogenes*. *Infection and Immunity* 70: 4968–4976
- Rochelle L. G., Fischer B. M., Adler K. B. (1998):** Concurrent production of reactive oxygen and nitrogen species by airway epithelial cells in vitro. *Free Radical Biology and Medicine* 24: 863–868
- Rooijackers S. H. and Strijp J. A. (2007):** Bacterial complement evasion. *Molecular Immunology* 44 (1-3): 23–32
- Roux C., Lee J. H., Jeffery C. J., Salmon L. (2004):** Inhibition of type I and type II phosphomannose isomerases by the reaction intermediate analogue 5-phospho-Darabinonohydroxamic acid supports a catalytic role for the metal cofactor. *Biochemistry* 43: 2926-2934
- Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. (1989):** *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York Cold Spring Harbour Lab. Press
- SantaLucia, J Jr. (1998):** A unified view of polymer, dumbbell, and oligonucleotide DNA nearest-neighbor thermodynamics. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95: 1460-1465
- Scheurwater E., Reid C. W., Clarke A. J. (2008):** Lytic transglycosylases: bacterial space-making autolysins. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 40: 586–591

Schleifer K.H., Kandler O. (1972): Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bacteriological Reviews* 36: 407–477

Sechman E. V., Rohrer M. S. and Seifert H. S. (2005): A genetic screen identifies genes and sites involved in pilin antigenic variation in *Neisseria gonorrhoeae*. *Molecular Microbiology* 57: 468–483

Sechman E. V., Kline K. A. and Seifert H. S. (2006): Loss of both Holliday junction processing pathways is synthetically lethal in the presence of gonococcal pilin antigenic variation. *Molecular Microbiology* 61: 185–193

Segal A. W. (2005): How neutrophils kill microbes. *Annual Review of Immunology* 23: 197–223

Selsted M. E., Szklarek D., Lehrer R. I. (1984): Purification and antibacterial activity of antimicrobial peptides of rabbit granulocytes. *Infection and Immunity* 45: 150–154

Selsted M. E., Szklarek D., Ganz T., Lehrer R. I. (1985): Activity of rabbit leukocyte peptides against *Candida albicans*. *Infection and Immunity* 49: 202–206

Serruto D., Rappuoli R., Scarselli M., Gros P., van Strijp J. A. (2010): Molecular mechanisms of complement evasion: Learning from staphylococci and meningococci. *Nature reviews. Microbiology*. 8 (6): 393–399

Sies H. (1993): Damage to plasmid DNA by singlet oxygen and its protection. *Mutation Research* 299: 183–191

Sies H. and Menck C. F. (1992): Singlet oxygen induced DNA damage. *Mutation Research* 275: 367–375

Simpson W. J., Lapenta D., Chen C., Cleary P. P. (1990): Coregulation of type 12 M protein and streptococcal C5a peptidase genes in group A streptococci: evidence for a virulence regulon controlled by the *virR* locus. *Journal of Bacteriology* 172: 696–700

Smith J. L. (2004): The physiological role of ferritin-like compounds in bacteria. *Critical Reviews in Microbiology* 30: 173–185

Smoot J. C., Barbian K. D., Van Gompel J. J., Smoot L. M., Chaussee M. S., Sylva G. L., Sturdevant D. E., Ricklefs S. M., Porcella S. F., Parkins L. D., et al. (2002): Genome sequence and comparative microarray analysis of serotype M18 group A *Streptococcus* strains associated with acute rheumatic fever outbreaks. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99 (7): 4668–4673

Snowden A., Kow Y. W., Van Houten B. (1990): Damage repertoire of the *Escherichia coli* UvrABC nuclease complex includes abasic sites, base damage analogues, and lesions containing adjacent 5' or 3' nicks. *Biochemistry* 29: 7251–7259

Stohl E. A. and Seifert H. S. (2006): *Neisseria gonorrhoeae* DNA recombination and repair enzymes protect against oxidative damage caused by hydrogen peroxide. *Journal of Bacteriology* 188: 7645–7651

Storz G. and Imlay J.A. (1999): Oxidative stress. *Current Opinion in Microbiology* 2: 188–194

Sumby P., Barbian K. D., Gardner D. J., Whitney A. R., Welty D. M., Long R. D., Bailey J.R., et al. (2005): Extracellular deoxyribonuclease made by group A *Streptococcus* assists pathogenesis by enhancing evasion of the innate immune response. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102: 1679–1684

Tan G. H., Gao Y., Shi M. (2005): Site Finding-PCR: a simple and efficient PCR method for chromosome walking. *Nucleic Acids Research* 33 (13): e122

Tani K., Murphy W. J., Chertov O., Salcedo R., Koh C. Y., Utsunomiya I., Funakoshi S., et al. (2000): Defensins act as potent adjuvants that promote cellular and humoral immune responses in mice to a lymphoma idiotype and carrier antigens. *International Immunology* 12: 691–700

Thibessard A., Fernandez A., Gintz B., Leblond-Bourget N., Decaris B. (2001): Hydrogen peroxide effects on *Streptococcus thermophilus* CNRZ368 cell viability. *Research in Microbiology* 152: 593–596

Thibessard A., Borges F., Fernandez A., Gintz B., Decaris B., Leblond-Bourget N. (2004): Identification of *Streptococcus thermophilus* CNRZ368 genes involved in defense against superoxide stress. *Applied and Environmental Microbiology* 70: 2220–2229

Timmer A. M., Timmer J. C., Pence M. A. Hsu L. C., Ghochani M., et al. (2009): Streptolysin O promotes group A *Streptococcus* immune evasion by accelerated macrophage apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry* 284: 862–871

Tokumoto U., Kitamura S., Fukuyama K., Takahashi Y. (2004): Interchangeability and distinct properties of bacterial Fe-S cluster assembly systems: functional replacement of the *isc* and *suf* operons in *Escherichia coli* with the *nifSU*-like operon from *Helicobacter pylori*. *Journal of Biochemistry* 136: 199–209

Touati D., Jacques M., Tardat B., Bouchard L., Despied S. (1995): Lethal oxidative damage and mutagenesis are generated by iron in delta fur mutants of *Escherichia coli*: protective role of superoxide dismutase. *Journal of Bacteriology* 177: 2305–2314

Touati D. (2000): Iron and oxidative stress in bacteria. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 373: 1–6

Toukoki C. and Gryllos I. (2013): PolA1, a putative DNA polymerase I, is coexpressed with PerR and contributes to peroxide stress defenses of group A *Streptococcus*. *Journal of Bacteriology* 195: 717–725

Tsou C. C., Chiang-Ni C., Lin Y. S., Chuang W. J., Lin M. T., Liu C. C., Wu J. J. (2008): An iron-binding protein Dpr decreases hydrogen peroxide stress and protects *Streptococcus pyogenes* against multiple stresses. *Infection and Immunity* 76: 4038–4045

Tsou C. C., Chiang-Ni C., Lin Y. S., Chuang W. J., Lin M. T., et al. (2010): Oxidative stress and metal ions regulate a ferritin-like gene, *dpr*, in *Streptococcus pyogenes*. International Journal of Medical Microbiology 300: 259–264

Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M. T. D., Mazur M., Telser J. (2007): Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. International Journal of Biochemistry and Cell Biology 39 (1): 44–84

Valko M., Rhodes C. J., Moncol J., Izakovic M., Mazur M. (2006): Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. Chemico-biological interactions 160: 1–40

van der Heide T. and B. Poolman (2002): ABC transporter: one, two or four substrate-binding domains? EMBO Reports 3: 938–943

von Köckritz-Blickwede M., Goldmann O., Thulin P., Heinemann K., Norrby-Teglund A., Rohde M., Medina E (2008): Phagocytosis-independent antimicrobial activity of mast cells by means of extracellular trap formation. Blood 111: 3070–3080

Wagner P. L. and Waldor M. K. (2002): Bacteriophage control of bacterial virulence. Infection and Immunity 70: 3985–3993

Wang J. R. and Stinson M. W. (1994): M protein mediates streptococcal adhesion to HEp-2 cells. Infection and Immunity 62: 442–448

Whitnack E. and Beachey E. H. (1985): Inhibition of complement-mediated opsonization and phagocytosis of *Streptococcus pyogenes* by D fragments of fibrinogen and fibrin bound to cell surface M protein. The Journal of Experimental Medicine 162: 1983–1997

Wimley W. C., Selsted M. E., White S. H. (1994): Interactions between human defensins and lipid bilayers: evidence for formation of multimeric pores. Protein Science 3: 1362–1373

Yamasaki K. and Gallo R. L. (2008): Antimicrobial peptides in human skin disease. European Journal of Dermatology 18: 11–21

Yang D., Chertov O., Bykovskaia S. N., Chen Q., Buffo M. J., Shogan J., Anderson M., et al. (1999): Beta-defensins: linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6. Science 286: 525–528

Yeaman M. R. and Yount N. Y. (2003): Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. Pharmacological Reviews 55: 27–55

Yeom S. J., Seo E. S., Kim B. N., Kim Y. S., Oh D. K. (2011): Characterization of a mannose-6-phosphate isomerase from *Thermus thermophilus* and increased L-ribose production by its R142N mutant. Applied and Environmental Microbiology 77: 762–776

Yesilkaya H., Kadioglu A., Gingles N., Alexander J. E., Mitchell T. J., Andrew P. W. (2000): Role of manganese-containing superoxide dismutase in oxidative stress and virulence of *Streptococcus pneumoniae*. Infection and Immunity 68: 2819–2126

Zanetti M. (2004): Cathelicidins, multifunctional peptides of the innate immunity. *Journal of Leucocyte Biology* 75: 39–48

Zasloff M. (2002): Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* 415: 389–395

Zuker M. (2003): Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Research* 31 (13): 3406-3415

6. Anhang

6.1. Geräte, Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

6.1.1. Geräte und Software

Abzug Airone FC-640; Safelab Systems Ltd. Indianapolis USA

Agarosegeldokumentationseinheit; Intas Science Imaging Instruments GmbH Göttingen
Deutschland

- UV System
- Gel Jet Imager
- Mitsubishi P91D

Elektroporationsgerät EquiBio Easyject Plus; PeqLab Biotechnologie GmbH Erlangen
Deutschland

Entwickler Röntgenfilm automatisch Typ Curix 60; Agfa Gevaert N. V. Mortsel Belgien
Eppendorf Multipette® Plus; Eppendorf AG Hamburg Deutschland

Gefrierschrank -20°C Liebherr comfort; Liebherr International AG Kirchdorf an der Iller
Deutschland

Gefrierschrank -80°C New Brunswick HEF U570; Eppendorf AG Hamburg Deutschland

Heizplatte Heating magnetic stirrer ARE; UniEquip GmbH Planegg Deutschland

Hybridisierungsöfen OV3 und OV5; Biometra® Göttingen Deutschland

Hybridisierungsröhren Thermo Hybaid HB-OV-BS; Thermo Fisher Scientific GmbH
Dreieich Deutschland

Inkubatoren Heraeus 30°C, 37°C, 37°C und 5 % CO₂; Thermo Fisher Scientific GmbH
Dreieich Deutschland

Kühlzentrifuge Typ Allegra™ 64R; Beckman Coulter GmbH Krefeld Deutschland

Lichtmikroskop Typ CKX41; Olympus Deutschland GmbH Hamburg Deutschland

Multimode Microplate Reader Infinite® 200 pro; Tecan Group AG Männedorf Schweiz

Picodrop Spektrophotometer V. 2.08; Picodrop™ Hinxton UK

pH/mV Meter Ultra Basic UB-10; Denver Instrument GmbH Göttingen Deutschland

Pipettierhilfe Accujet® pro; Brand Biotech Melsungen Deutschland

Präzisionswaage BP4100S; Sartorius Göttingen Deutschland

Präzisionswaage E1200S; Sartorius Göttingen Deutschland

Ribolyser; Hybaid Ashford UK

Röntgenfilmkassette PL-B/PL-BW; Konika Minolta Holdings Inc. Marunouchi Japan

Schüttelinkubator KS 4000 I Control; IKA® Werke GmbH u. Co. KG Staufen Deutschland
Schüttler Rocking platform; Biometra® Göttingen Deutschland
Spritzen Discardit™ II 2 ml, 5 ml und 20 ml; BD (Becton Dickinson) GmbH Heidelberg
Deutschland
Sterilwerkbank Biowizard; Kojair® Tech Oy Vilppula Finnland
Stromversorgung PowerPac™ HC; BioRad München Deutschland
SpectraMax M2 Multimode Microplate Reader; Molecular Devices
Thermocycler T3; Biometra® Göttingen Deutschland
Thermoschüttler Thermomixer® compact; Eppendorf AG Hamburg Deutschland
Zählkammer Bürker; Lo-Laboroptik Friedrichsdorf Deutschland
UV Kammer GS gene linker™; BioRad München Deutschland
UV/Vis-Spectrophotometer Smart Spec™ Plus; BioRad München Deutschland
Vakuum-Tischzentrifuge RVC 2-18; Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH
Osterode am Harz Deutschland
Wasserbad GFL 1086; Gesellschaft für Labortechnik mbH Großburgwedel Deutschland
Zählkammermodell Bürker; Feinoptik GmbH Bad Blankenburg Deutschland
Zentrifuge Heraeus Biofuge Pico; DJB Labcare Ltd. Newport Pagnell UK
Zentrifuge Heraeus Megafuge Typ 1.0R; DJB Labcare Ltd. Newport Pagnell UK

6.1.2. Chemikalien und Reagenzien

ABTS; Sigma-Aldrich GmbH Steinheim Deutschland
Adeninsulfat; Sigma-Aldrich GmbH Steinheim Deutschland
Agar, technisch Nr. 3; Oxoid Deutschland GmbH Wesel Deutschland
Alanin (D/L); Sigma-Aldrich GmbH (Fluka/Riedel-de Haën) Steinheim Deutschland
Aminobenzoesäure; Sigma-Aldrich GmbH (Fluka/Riedel-de Haën) Steinheim Deutschland
Ampizillin; Sigma-Aldrich GmbH Steinheim Deutschland
Anti-DIG-Antikörper AP-konjugiert; Roche Applied Science Deutschland GmbH Mannheim
Deutschland
Argenin (L); Roth GmbH Karlsruhe Deutschland
Asparagin (L); Sigma-Aldrich GmbH (Fluka/Riedel-de Haën) Steinheim Deutschland
Asparaginsäure (L); Sigma-Aldrich GmbH Steinheim Deutschland
Betain; Sigma-Aldrich GmbH Steinheim Deutschland
Biotin; Sigma-Aldrich GmbH Steinheim Deutschland
Blockingreagenz; Roche Applied Science Deutschland GmbH Mannheim Deutschland

Chloroform; J.T Baker Deventer Niederlande
CSPD (25 mM); Roche Applied Science Deutschland GmbH Mannheim Deutschland
Cystein (L); Sigma-Aldrich GmbH Steinheim Deutschland
Cystin (L); Sigma-Aldrich GmbH (Fluka/Riedel-de Haën) Steinheim Deutschland
DEPC; Sigma-Aldrich GmbH Steinheim Deutschland
DIG 11 dUTP; Roche Applied Science Deutschland GmbH Mannheim Deutschland
DMEM+GlutaMAX™+Pyruvat; Invitrogen™ Life Technologies GmbH Carlsbad USA
DMEM+GlutaMAX™; Invitrogen™ Life Technologies GmbH Carlsbad USA
DNA-Ladepuffer 6 x Fermentas; Thermo Fisher Scientific GmbH Dreieich Deutschland
DNA Molecular Weight Marker II DIG-labeled; Roche Applied Science Deutschland GmbH Mannheim Deutschland
Eisen (II) nitrat x 9 H₂O; Sigma-Aldrich GmbH (Fluka/Riedel-de Haën) Steinheim Deutschland
Eisen (III) sulfat x 7 H₂O; Sigma-Aldrich GmbH (Fluka/Riedel-de Haën) Steinheim Deutschland
Ethidiumbromid; Sigma-Aldrich GmbH Steinheim Deutschland
Ethyldiamintetraessigsäure; Merck KGaA Darmstadt Deutschland
Essigsäure 100 %; AppliChem GmbH Darmstadt Deutschland
Erythromycin; Sigma-Aldrich GmbH Steinheim Deutschland
Ethanol 96 %; Roth GmbH Karlsruhe Deutschland
Folsäure; Sigma-Aldrich GmbH (Fluka/Riedel-de Haën) Steinheim Deutschland
Formaldehyd 37 %; Roth GmbH Karlsruhe Deutschland
Formamid deionisiert; Roth GmbH Karlsruhe Deutschland
GeneRuler™ 1 kbp DNA Leiter Fermentas; Thermo Fisher Scientific GmbH Dreieich Deutschland
GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Leiter Fermentas; Thermo Fisher Scientific GmbH Dreieich Deutschland
Glukose; Merck KGaA Darmstadt Deutschland
Glutamin (L); Sigma-Aldrich GmbH (Fluka/Riedel-de Haën) Steinheim Deutschland
Glutaminsäure (L); Sigma-Aldrich GmbH (Fluka/Riedel-de Haën) Steinheim Deutschland
Glycerin 100 %; Merck KGaA Darmstadt Deutschland
Glycin; Roth GmbH Karlsruhe Deutschland
Guanin HCl H₂O; Sigma-Aldrich GmbH (Fluka/Riedel-de Haën) Steinheim Deutschland
Hexadecan; VWR International GmbH Darmstadt Deutschland

Histidin (L); Sigma-Aldrich GmbH Steinheim Deutschland
Hybridisierungspuffer DIG Easy Hyb; Roche Applied Science Deutschland GmbH
Mannheim Deutschland
Isoleucin (L); Sigma-Aldrich GmbH (Fluka/Riedel-de Haën) Steinheim Deutschland
Kälberserum foetal „Gold“; PAA Laboratories GmbH Pasching Österreich
Kaliumazetat; Merck KGaA Darmstadt Deutschland
Kaliumchlorid; Merck KGaA Darmstadt Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat; Merck KGaA Darmstadt Deutschland
Dikaliumhydrogenphosphat; Roth GmbH Karlsruhe Deutschland
Kalziumchlorid; Merck KGaA Darmstadt Deutschland
Kanamycin; Sigma-Aldrich GmbH Steinheim Deutschland
Leucin (L); Sigma-Aldrich GmbH (Fluka/Riedel-de Haën) Steinheim Deutschland
Lysin (L) H₂O; Merck KGaA Darmstadt Deutschland
Magnesiumchlorid; Sigma-Aldrich GmbH (Fluka/ Riedel-de Haën) Steinheim Deutschland
Magnesiumsulfat x 7 H₂O; Merck KGaA Darmstadt Deutschland
Maleinsäure; Merck KGaA Darmstadt Deutschland
Mangan (II) sulfat H₂O; Sigma-Aldrich GmbH (Fluka/Riedel-de Haën) Steinheim
Deutschland
MassRuler™ Express Forward DNA Leiter Fermentas; Thermo Fisher Scientific GmbH
Dreieich Deutschland
Methionin (L); Sigma-Aldrich GmbH (Fluka/ Riedel-de Haën) Steinheim Deutschland
Natriumazetat; Merck KGaA Darmstadt Deutschland
Natriumbicarbonat; Merck KGaA Darmstadt Deutschland
Natriumchlorid; Roth GmbH Karlsruhe Deutschland
Natriumcitrat (Tri-Natriumcitrat-Dihydrat); Merck KGaA Darmstadt Deutschland
Natriumdodecylsulfat; Roth GmbH Karlsruhe Deutschland
Natriumdihydrogenphosphat; Merck KGaA Darmstadt Deutschland
Dinatriumhydrogenphosphat; Merck KGaA Darmstadt Deutschland
Natriumhydroxid; Sigma-Aldrich GmbH Steinheim Deutschland
Nicotinamid; Sigma-Aldrich GmbH Steinheim Deutschland
Nicotinamidadenindinukleotid (NADH); Sigma-Aldrich GmbH Steinheim Deutschland
Ca-Pantothensäure; Sigma-Aldrich GmbH (Fluka/ Riedel-de Haën) Steinheim Deutschland
Penicillin-Streptomycin 5000 U/ml u. 5000 µg/ml; Invitrogen™ Life Technologies GmbH
Carlsbad USA

peqGOLD High Range RNA-Leiter; PEQLAB Biotechnologie GmbH Erlangen Deutschland
Phenol, Roti®-Phenol (pH 8,0) und Roti®-Aqua-Phenol (pH 4,5-5); Roth GmbH Karlsruhe
Deutschland

Phenylalanin (L); Sigma-Aldrich GmbH (Fluka/ Riedel-de Haën) Steinheim Deutschland

Prolin (L); Sigma-Aldrich GmbH Steinheim Deutschland

Hydroxyprolin (L); Sigma-Aldrich GmbH (Fluka/ Riedel-de Haën) Steinheim Deutschland

Pyridoxal HCl; Sigma-Aldrich GmbH Steinheim Deutschland

Pyridoxamin x 2 HCl; Sigma-Aldrich GmbH Steinheim Deutschland

Riboflavin; Sigma-Aldrich GmbH (Fluka/ Riedel-de Haën) Steinheim Deutschland

Saponin; Sigma-Aldrich GmbH Steinheim Deutschland

Schafsblut defibriniert; Oxoid Deutschland GmbH Wesel Deutschland

Serin (L); Sigma-Aldrich GmbH Steinheim Deutschland

Serum human; Sigma-Aldrich GmbH Steinheim Deutschland

Spektinomycin Pentahydrate; MP Biomedicals Deutschland GmbH Eschwege Deutschland

Sukrose; Serva Electrophoresis Heidelberg Deutschland

Thiamin HCl; Sigma-Aldrich GmbH Steinheim Deutschland

Threonin (L); Sigma-Aldrich GmbH (Fluka/ Riedel-de Haën) Steinheim Deutschland

Tryptophan (L); Sigma-Aldrich GmbH (Fluka/ Riedel-de Haën) Steinheim Deutschland

Todd-Hewitt-Broth Nährmedium; Oxoid Deutschland GmbH Wesel Deutschland

TRIS Hydrochlorid; Roth GmbH Karlsruhe Deutschland

TRIS Trizma® Base; Sigma-Aldrich GmbH Steinheim Deutschland

Trypan-Blau-Färbung 0,4 %; Invitrogen™ Life Technologies GmbH Carlsbad USA

Tween® 20; Serva Electrophoresis GmbH Heidelberg Deutschland

Tyrosin (L); Sigma-Aldrich GmbH Steinheim Deutschland

Uracil; Sigma-Aldrich GmbH Steinheim Deutschland

Valin (L); Sigma-Aldrich GmbH Steinheim Deutschland

Wasserstoffperoxid 30 %; Roth GmbH Karlsruhe Deutschland

6.1.3. Verbrauchsmaterialien und Kits

ABI PRISM™ BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit; Invitrogen™ Life
Technologies GmbH Carlsbad USA

Columbia-Blutagarplatten 5 % Schafsblut; bioMérieux Deutschland GmbH Nürtingen
Deutschland

DNeasy Blood and Tissue Kit; Qiagen GmbH Hilden Deutschland

Easy Sealer transparent 80 X 140 mm; Greiner Bio-One Frickenhausen Deutschland
Einmalhandschuhe Sterling Nitril; Kimberly-Clark GmbH Koblenz Deutschland
Elektroporationsküvetten 2 mm Elektrodenabstand; PEQLab Biotechnologie GmbH
Erlangen Deutschland
Eppendorf Combitip® Plus 5 ml; Eppendorf AG Hamburg Deutschland
Eppendorf Combitip® Plus 10 ml; Eppendorf AG Hamburg Deutschland
Eppendorf Reaktionsgefäße 0,5 ml Safe-Lock; Eppendorf AG Hamburg Deutschland
Eppendorf Reaktionsgefäße 1,5 ml Safe-Lock; Eppendorf AG Hamburg Deutschland
Eppendorf Reaktionsgefäße 2,0 ml Safe-Lock; Eppendorf AG Hamburg Deutschland
FastRNA® Pro Blue Kit; MP Biomedicals GmbH Eschwege Deutschland
Mikro-Schraubenröhrchen 2,0 ml; Sarstedt AG und Co Nümbrecht Deutschland
Nylon-Membran Biodyne® positiv geladen 0,45 µm; Pall Corporation Portsmouth UK
Nylon-Membran Biodyne® amphoterisch 0,2 µm; Pall Corporation Portsmouth UK
Objektglasträger 76 x 26 mm; Knittel Glasbearbeitung GmbH Braunschweig Deutschland
Petrischalen 92 x 16 mm; Sarstedt AG und Co Nümbrecht Deutschland
Pipettenspitzen 1 ml blaue Spitzen; Sarstedt AG und Co Nümbrecht Deutschland
Pipettenspitzen 200 µl gelbe Spitzen; Sarstedt AG und Co Nümbrecht Deutschland
Pipettenspitzen 10 µl TipOne® graduert; StarLab GmbH Hamburg Deutschland
QIAquick Gelextraction Kit; Qiagen GmbH Hilden Deutschland
QIAquick PCR Purification Kit; Qiagen GmbH Hilden Deutschland
Replikatoren 96-Well Format; Sigma-Aldrich GmbH Steinheim Deutschland
Sterilfilter 0,2 µm für 500 ml; Corning GmbH Kaiserslautern Deutschland
Sterilfilter 0,2 µm für 150 ml; Corning GmbH Kaiserslautern Deutschland
Sterilfilter 0,2 µm Sterifix Injektionsfilter; B. Braun Melsungen AG Melsungen Deutschland
SuperScript™ First-Strand Synthese System für RT-PCR; Invitrogen™ Life Technologies
GmbH Carlsbad USA
Zellkulturflaschen 75 cm²; Greiner Bio-One Frickenhausen Deutschland
Zentrifugengefäße 15 ml; Greiner Bio-One Frickenhausen Deutschland
Zentrifugengefäße 50 ml; Greiner Bio-One Frickenhausen Deutschland

6.1.4. Plasmide und Enzyme

DNase I (1U/µl) RNase-free; Epicentre® Wisconsin USA
HRP, Typ II Peroxidase; Sigma-Aldrich GmbH Steinheim Deutschland
Hyaluronidase Typ II; Sigma-Aldrich GmbH Steinheim Deutschland

Lysozym; Roche Applied Science Deutschland GmbH Mannheim Deutschland

Mutanolysin von *Streptomyces globisporus* ATCC 21553; Sigma-Aldrich GmbH Steinheim Deutschland

pASK-IBA3c; IBA GmbH Göttingen Deutschland

pBlueScript II KS (+) Fermentas; Thermo Fisher Scientific GmbH Dreieich Deutschland

Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase; Thermo Fisher Scientific GmbH Dreieich Deutschland

PlyC (6,32 µg/ml); Novartis Siena Italien

RNase (DNase frei); Roche Applied Science Deutschland GmbH Mannheim Deutschland

Taq (DNA) Polymerase (5 U/µl); Qiagen GmbH Hilden Deutschland

Trypsin-EDTA 0,25%; Invitrogen™ Life Technologies GmbH Carlsbad USA

6.1.5. antimikrobielle Peptide

Beta-Defensin 3 human; PeproTech® Hamburg Deutschland

Colistin (sulfatsalz); Sigma-Aldrich GmbH Steinheim Deutschland

LL-37 Peptid; Innovagen AB Lund Schweden

Menadion (natriumbisulfit); Sigma-Aldrich GmbH Steinheim Deutschland

Protamin (sulfatsalz); Sigma-Aldrich GmbH Steinheim Deutschland

6.2. Zusammensetzung CDM

Das für diese Arbeit verwendete CDM / Glukose setzte sich wie folgt zusammen:

Na ₂ HPO ₄	7,35 g
NaH ₂ PO ₄	3,2 g
Na(CH ₃ COO)	4,5 g

wurden in 200 ml *A.dest.* gelöst. Anschließend wurden die in Tabelle 13 aufgeführten Stammlösungen wie folgt zugesetzt:

1	Phosphatbuffer	10 ml
2	Asparagine	20 ml
3	Aminosäuren Mix	20 ml
4	L-Leucin	20 ml
5	L-Glutaminsäure	3,4 ml
6	D/L-Alanin	5 ml

7	L-Isoleucin	10 ml
8	L-Methionin	10 ml
9	L-Threonin	10 ml
10	L-Argenin HCl	5 ml
11	L-Histidin HCl H ₂ O	5 ml
12	L-Thryptophan	5 ml
13	L-Valin	5 ml
14	L-Lysin	5 ml
15	Riboflavin	25 ml
16	Vitamin Mix	25 ml
17	Biotin	20 ml
18	Folsäure	40 ml
19	Pyridoxamin 2HCl	6,25 ml
20	L-Glutamin	10 ml
25	L-Cystin	5 ml
26	L-Tyrosin	10 ml
27	AGU Mix	44 ml
28	MgSO ₄ x 7 H ₂ O	5 ml
29	Salzlösung	5 ml
	Pyridoxal HCl	1 mg
	NADH	2,5 mg
	H ₂ O	ad. 1000 ml

Der pH Wert wurde auf 7,4 eingestellt. Nach dem Sterilfiltrieren wurde das CDM für maximal 14 Tage bei 4 °C gelagert. Kurz vor dem Gebrauch erfolgte die Zugabe von Glukose (Konz. siehe 2.3.) und der Komponenten 30 und 31 (Tabelle 13) zu dem Medium. Komponenten 30 und 31 wurden steril filtriert und wie folgt verwendet:

30	Natriumbicarbonat	200 µl
31	L-Cystein	100 µl auf 10 ml CDM

Tab. 13: Zusammensetzung und Pipettierschema der zur Herstellung von CDM verwendeten Lösungen.

Nr.	Name	Komponenten	Menge		Zum Lösen zugeben:		Endvol. in ml	Besonderes
			g	mg	Erste Komponente	Zweite Komponente		
1	Phosphatbuffer	KH ₂ PO ₄	2			H ₂ O	100	
		K ₂ HPO ₄	10					
2	Asparagin		1			H ₂ O	200	
3	Aminosäuren Mix	L-Asparaginsäure	2		6,4 ml 2,5 N NaOH	H ₂ O	400	Erhitzen notwendig, nicht höher als 57°C
		L-Phenylalanin	2					
		L-Serin	2					
		L-Prolin	4					
		L-Hydroxyprolin	4					
		Glycin	4					
4	L-Leucin		1			H ₂ O	100	Erhitzen notwendig, nicht höher als 57°C
5	L-Glutaminsäure		6		19,2 ml 2,5 N NaOH	H ₂ O	200	
6	D/L-Alanin		4			H ₂ O	200	
7	L-Isoleucin		2			H ₂ O	200	Erhitzen notwendig, nicht höher als 57°C
8	L-Methionin		2			H ₂ O	200	Erhitzen notwendig, nicht höher als 57°C
9	L-Threonin		2			H ₂ O	100	Erhitzen notwendig, nicht höher als 57°C
10	L-Argenin HCl		4,84			H ₂ O	200	
11	L-Histidin HCl H ₂ O		5,4			H ₂ O	200	
12	L-Thryptophan		4		20 ml 2N HCl	H ₂ O	200	
13	L-Valin		2			H ₂ O	100	
14	L-Lysin H ₂ O		2,76			H ₂ O	100	
15	Riboflavin			8	0,1 ml konz. Essigsäure	H ₂ O	100	
16	Vitamin Mix	Nicotinamid		100		H ₂ O	250	
		Thiamin HCl		20				
		Aminobenzoesäure		4				
		Ca-Pantothensäure		20				
17	Biotin			5	5 mg in 1 ml 95% EtOH + 49 ml 0,01N HCl	20 ml of Mix to 180 ml 0,01 N HCl	200	Dunkel lagern

Fortsetzung Tab. 13:

Nr.	Name	Komponenten	Menge		Zum Lösen zugeben:		Endvol. in ml	Besonderes
			g	mg	Erste	Zweite		
					Komponente			
18	Folsäure			5	0,1 ml 2,5 N NaOH	H ₂ O	250	
19	Pyridoxamin 2HCl			23		H ₂ O	100	
20	L-Glutamin		4			H ₂ O	200	
25	L-Cystin		4		80 ml 2 N HCl	H ₂ O	400	
26	L-Tyrosin		4		16 ml 2,5 N NaOH	H ₂ O	400	
27	AGU Mix	Adenine sulfate		435	50 ml 2 N HCl	H ₂ O	500	
		Guanine HCl H ₂ O		310				
		Uracil		250				
28	MgSO ₄ x 7 H ₂ O		7		1 ml 2 N HCl	H ₂ O	50	
29	Salzlösung	FeSO ₄ x 7 H ₂ O		100	1,2 ml 2 N HCL	H ₂ O	100	
		CaCl ₂		200				
		MnSO ₄ x H ₂ O		100				
		Fe(NO ₃) ₃ x 9 H ₂ O		20				
30	Natriumbikarbonat		1.25			H ₂ O	10	Erhitzen notwendig, nicht höher als 57°C
31	L-Cystein			250		H ₂ O	5	Erhitzen notwendig, nicht höher als 57°C

Die hier aufgeführten Stammlösungen wurden bis zum Gebrauch bei 4 °C gelagert.

6.3. Einzelergebnisse

6.3.1. Southern-Blot Analysen

Originalbilder der Southern-Blot Untersuchungen einer Auswahl von insgesamt 56 *TnSpc*-Mutanten zur Bestimmung der Anzahl integrierter Transposonelemente. Alle aufgeführten Mutantenstämme wurden aufgrund ihrer veränderten Toleranz gegenüber den oxidativen Substanzen H₂O₂ und Menadion sowie dem antimikrobiellen Peptid Colistin selektiert. Weiterführende Experimente zur Identifizierung der *TnSpc*-Insertionsstelle erfolgten ausschließlich mit Stämmen, welche eine einmalige Insertion des Transposonelements aufwiesen. Desweiteren wurden alle nicht-hämolysierenden Stämme mittels Southern-Blot auf die Anzahl ihrer integrierten *TnSpc*-Elemente untersucht. Als Sonde dienten jeweils

Digoxigenin-markierte Fragmente der Spektinomycin-Resistenzkassette aus pMGC57-spc (s. Abschnitt 2.6.8.2.).

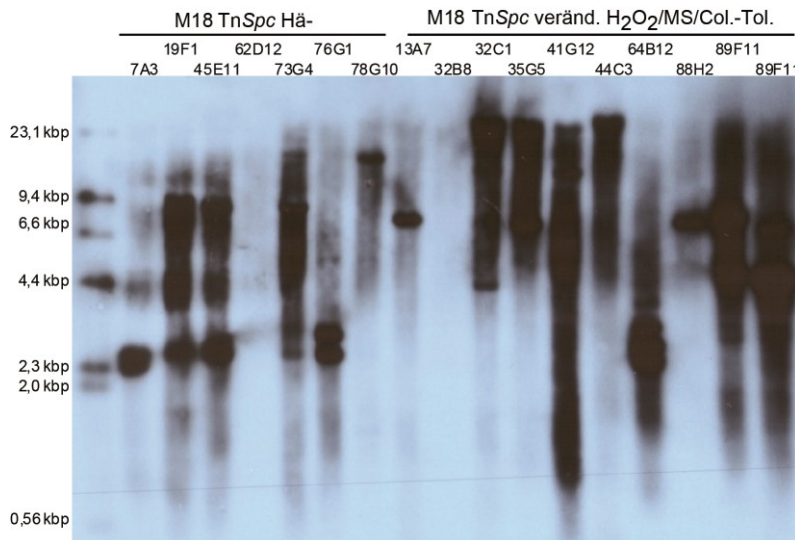


Abb. 26: Southern-Blot einer Auswahl an M18 TnSpc-Stämmen.

Insertionsmutanten mit fehlender Hämolyseeigenschaft (Hä-) als auch mit veränderter Sensitivität gegenüber H_2O_2 u./o. MS u./o. Col. wurden bezüglich der Anzahl integrierter TnSpc-Elemente untersucht. Jeweils 3 μ g genomische DNA wurden in mit *Pst*I verdaut und mit einem Digoxigenin-markierten *aad9* Fragment hybridisiert.

Eine mehrfache Insertion des TnSpc-Elements aus pMGC57-spc konnte für folgende γ -hämolisierende Stämme nachgewiesen werden: 7A3; 19F1; 45E11; 73G4 und 76G1. Für Stamm 62D12 wurde kein Signal detektiert und 78G10 besaß nachweislich nur ein TnSpc-Element.

Insertionsmutanten 41G12, 64B12 und 89F11 mit einer veränderten Toleranz gegenüber oxidativen Streß und antimikrobiellen Peptiden zeigten eine mehrfache Insertion von TnSpc. Für Stamm 32C1, 35G5 und 44C3 konnten keine eindeutigen Ergebnisse erzielt werden. Gründe hierfür waren eventuell ein unvollständiger Verdau der gDNA und/oder eine unvollständige elektrophoretische Auftrennung. 13A7 und 88H2 waren durch ein einzelnes TnSpc-Element gekennzeichnet.

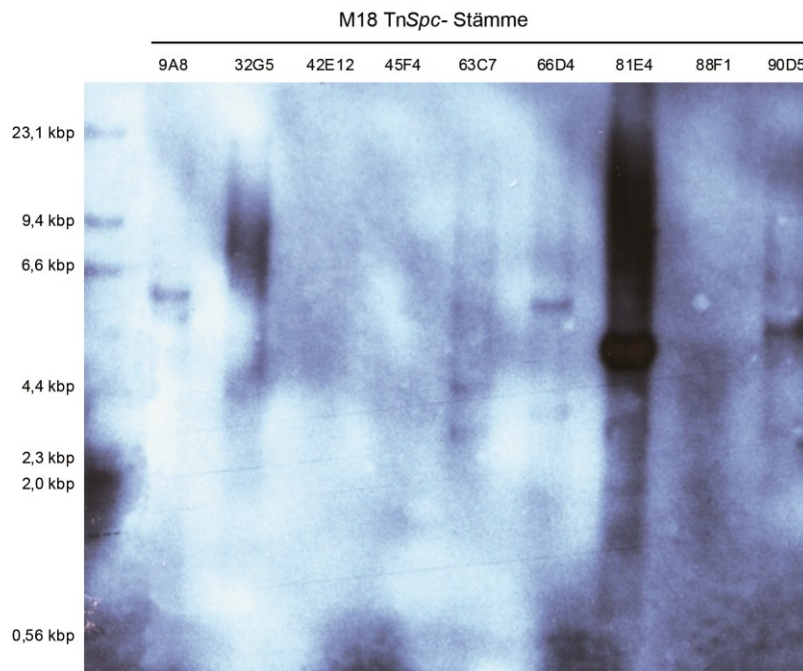


Abb. 27: Southern-Blot von *TnSpc*-Mutanten des Serotyps M18 mit einer veränderten Sensitivität gegenüber H_2O_2 u./o. MS u./o. Col.

3 μ g *Pst*I-verdaute gDNA wurden jeweils eingesetzt. Als Sonde wurde ein Digoxigenin-markiertes *aad9*-Fragment verwendet.

Für die Stämme 9A8, 63C7, 66D4 und 90D5 wurde eine zweifache Insertion des *TnSpc*-Elements nachgewiesen. M18 *TnSpc*-Stamm 81E4 wies ein einzelnes Transposonelement auf. Kein SONDENSIGNAL wurden für 32G5, 42E12, 45F4 und 88F1 erzielt. Ursachen hierfür waren zu geringe Mengen an gDNA oder eine unvollständige Auftrennung der geschnittenen gDNA.

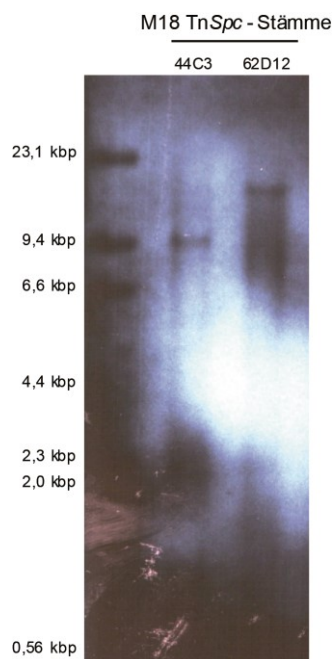


Abb. 28: Southern-Blot der M18 *TnSpc*-Mutante 44C3.

M18 *TnSpc*-Mutante 44C3 besaß eine veränderte Toleranz gegenüber H_2O_2 und MS. 62D12 war durch das Fehlen der Hämolyse gekennzeichnet.

Für beide untersuchte Stämme (44C3 und 62D12) konnte die einmalige Insertion von *TnSpc* in das Genom von Serotyp M18 nachgewiesen werden.

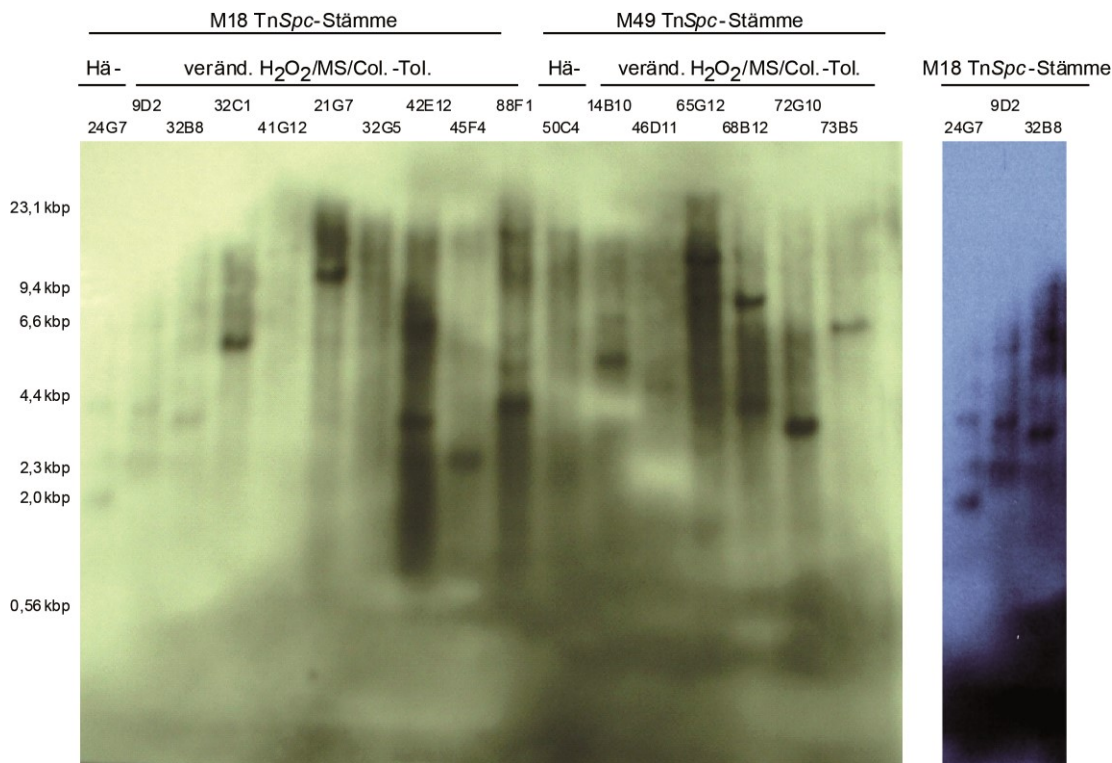


Abb. 29: Southern-Blot-Analyse von *TnSpc*-Mutanten des Serotyps M18 und M49.

TnSpc-Mutanten des Serotyps M18 und M49 waren gekennzeichnet durch ein verändertes Toleranzverhalten gegenüber oxidativem Stress u/o. dem antimikrobiellen Peptid Colistin. Zusätzlich wurden nicht-hämolysierende Stämme untersucht.

Ein mehrfacher Einbau von *TnSpc* erfolgte für die Stämme des Serotyps M18: 9D2; 32B8; 42E12 und 88F1. Der nicht-hämolysierende Stamm 24G7 zeigte eine Insertion von zwei Transposonelementen. Fehlende Signale erhielt man für die Stämme 41G12 und 32G5.

Bei Serotyp M49 konnten lediglich für den Stamm 68B12 zwei *TnSpc*-Elemente nachgewiesen werden. Für den nicht-hämolysierenden Stamm 50C4 und Stamm 46D11, welcher eine erhöhte Sensitivität gegenüber Colistin im Vergleich zum WT besaß, wurde kein Signal detektiert. Die restlichen Insertionsmutanten (14B10; 65G12; 72G10 und 73B5) waren durch das Vorhandensein von einem *TnSpc*-Element gekennzeichnet.

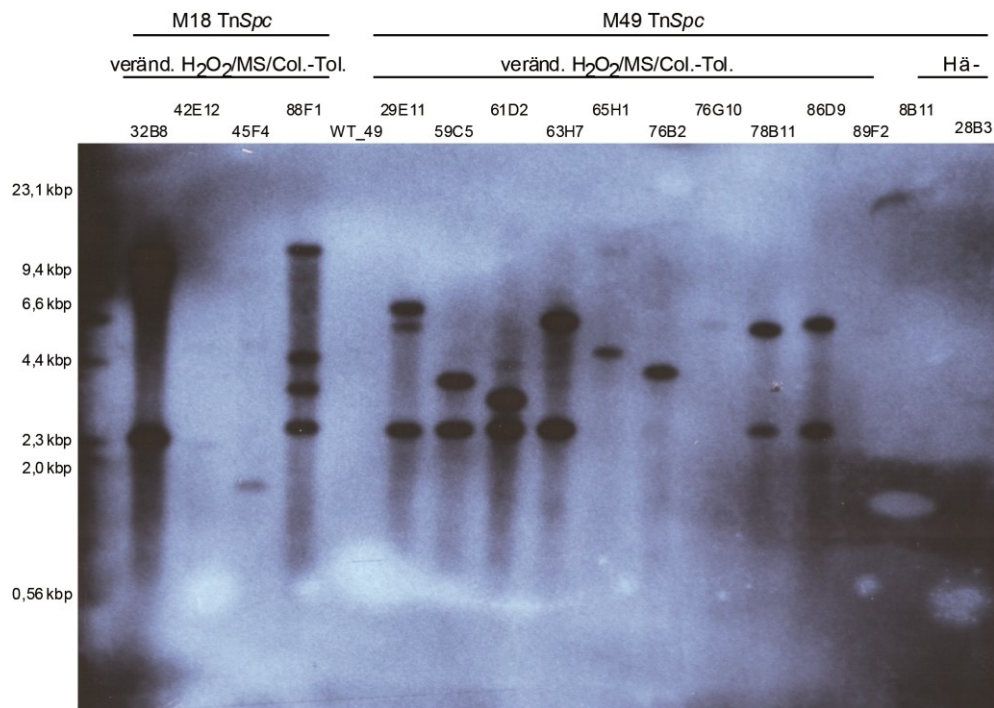


Abb. 30: Southern-Analyse von TnSpc-Insertionsmutanten des Serotyps M18 und M49. Sowohl Mutanten mit veränderter Sensitivität gegenüber H₂O₂ u./o. MS u./o. Col. als auch verändertem Hämolyseverhalten wurden untersucht.

Für M18 konnte lediglich bei Stamm 45F4 die Insertion von einem Transposonelement nachgewiesen werden. 32B8 und 88F1 zeigten zwei bzw. vier integrierte Spektinomycinkassetten von TnSpc. Kein Signal konnte bei 42E12 detektiert werden.

Transposonmutanten des Serotyps M49 Stamm 29E11, 59C5, 61D2, 63H7, 78B11 und 86D9 waren mit zwei oder mehr TnSpc-Elementen ausgestattet. Eine einfache Insertion erfolgte in Stamm 65H1, 76B2 und 76G10. Kein Signal wurde für den WT und die Stämme 89F2, 8B11 und 28B3 detektiert.

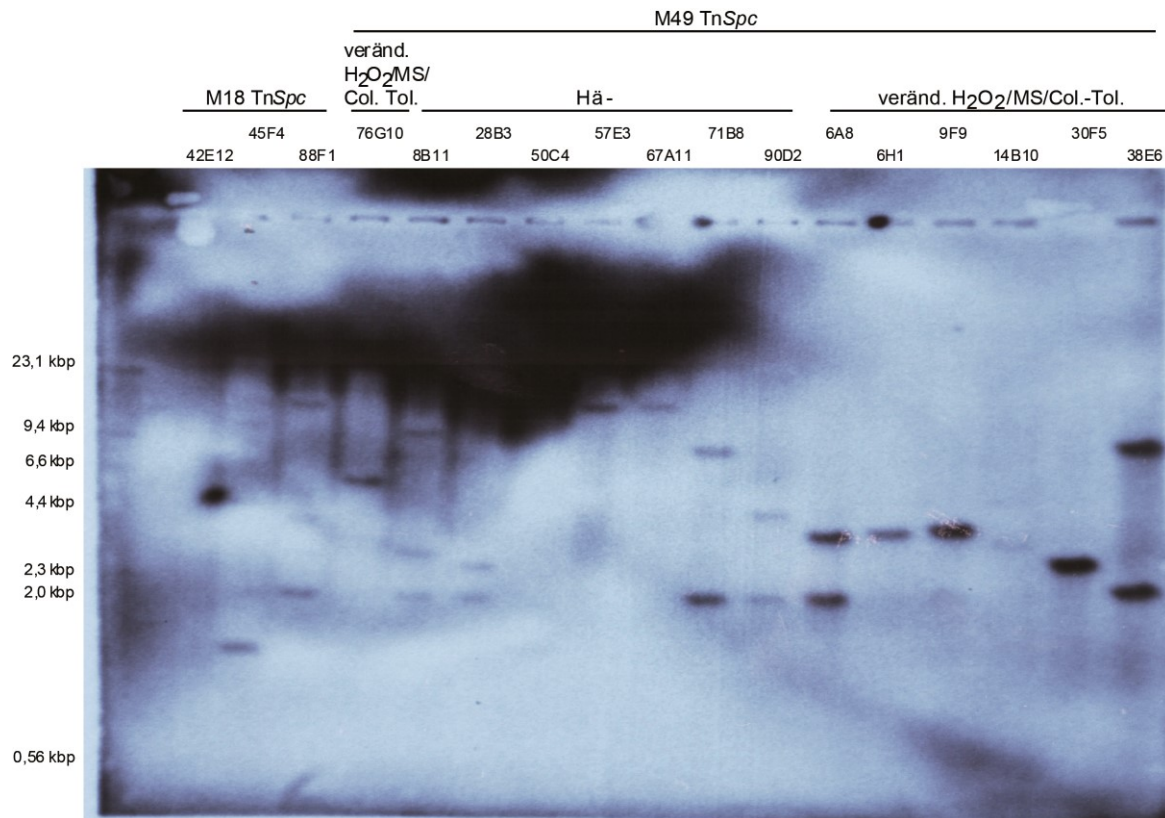


Abb. 31: Southern-Blot von M18 und M49 *TnSpc*-Mutanten zur Bestimmung der Anzahl integrierter Transposonelemente.

Alle Mutantenstämme wurden Aufgrund des Verlustes der β -Hämolysse oder einer veränderten Toleranz gegenüber oxidativem Stress (H_2O_2 u./o. MS) bzw. antimikrobiellen Peptiden (Col.) ausgewählt.

In Serotyp M18 *TnSpc*-Stamm 42E12 konnte kein Sondersignal detektiert werden. Dagegen konnte für 45F4 ein *TnSpc*-Element und für 88F1 zwei Transposonelemente nachgewiesen werden.

Bei folgenden nicht-hämolysierenden Insertionsmutanten des Serotyps M49 wurden mind. zwei *TnSpc*-Elemente detektiert: 8B11; 28B3, 71B8 und 90D2. Stamm 57E3 und 67A11 besaßen ein Transposonelement. M49::*TnSpc* mit einem verändertem Toleranzverhalten zu H_2O_2 u./o. MS u./o. Col. im Vergleich zum WT zeigte sich bei 6A8 und 38E6 der Einbau von zwei *TnSpc*-Elementen. Nur ein Transposonelement wurde bei den Stämmen 76G10, 6H1, 9F9, 14B10 und 30F5 detektiert.

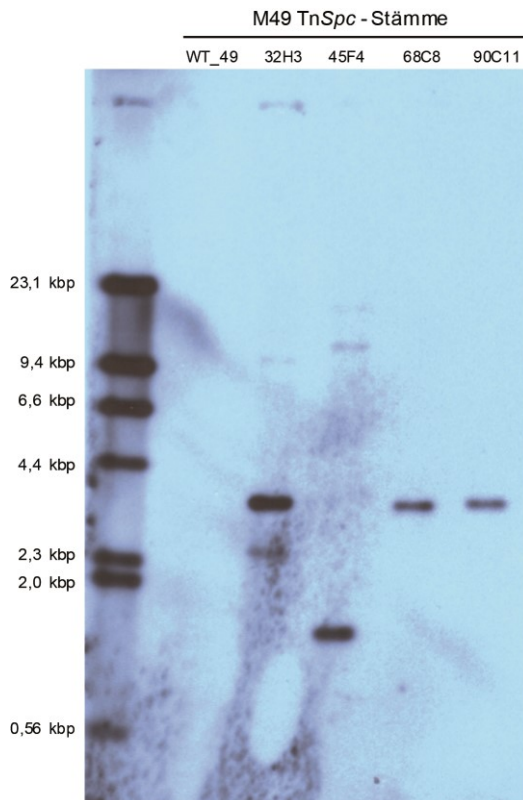


Abb. 32: Untersuchung der Anzahl eingebauter Transposonelemente ins Genom von M49::TnSpc Stämmen.

Mittels Southern-Blot-Analyse wurde die Anzahl integrierter TnSpc-Elemente ermittelt. Die aufgeführten Mutantenstämme besaßen im Vergleich zum WT eine veränderte Sensitivität gegenüber oxidativen Substanzen (H₂O₂ u./o. MS) und/oder dem antimikrobiellen Peptid Colistin (Col.).

In den TnSpc-Insertionsmutanten des Serotyps M49 32H3, 45F4, 68C8 und 90C11 erfolgte der Einbau von einem Transposonelement in das Genom. Weitere unspezifische schwache Signale wurden für den Stamm 32H3 und 45F4 detektiert.

In Tab. 14 wurde für jeden untersuchten Stamm eine Zusammenstellung der beobachteten Phänotypen aus den unterschiedlichen Selektionsrunden sowie die Anzahl integrierter Transposonelemente dargestellt.

Tab. 14: Übersicht der mittels Southern-Blot untersuchten M18 und M49 TnSpc-Mutanten.

Die Übersicht schließt die beobachteten Phänotypen aus den verschiedenen Selektionsdurchgängen und Anzahl eingebauter Transposonelemente mit ein.

M18 Stamm- Nr.	Phänotyp 1. Selektion	Phänotyp Bestätigungsrunden	Anzahl integrierter TnSpc- Elemente
9A8	MS-	MS-	2

Fortsetzung Tab. 14:

M18

Stamm-Nr.	Phänotyp 1. Selektion	Phänotyp Bestätigungsrounden	Anzahl integrierter Tn <i>Spc</i> -Elemente
9D2	MS-	H-	2
13A7	MS-	MS- und Col.-	1
21G7	MS-	H-	2
32B8	MS- und H-	H+ und Col.+	2
32C1	MS-	MS- und H-	1
32G5	MS-	MS-	2
35G5	MS-	MS- und H-	2 (keine deutl. abgegrenzten Signale)
41G12	MS-	MS- und Col.-	3
42E12	MS- und H-	H+	2
44C3	MS-	MS-	1
45F4	MS-	MS- und Col.-	1
63C7	MS-	MS- und Col.+	2
64B12	MS-	MS- und Col.-	3
66D4	MS-	MS-, H- und Col.-	2
81E4	H-	H-	1
88F1	MS-	MS+	4
88H2	MS-	MS-	1
89F11	MS- und H-	H+ und Col.+	2
90D5	MS- und H-	H- und Col.	1
7A3	Hä-	Hä-	2
19F1	Hä-	Hä-	3
24G7	Hä-	Hä-	2
45E11	Hä-	Hä-	3
62D12	Hä-	Hä-	1
73G4	Hä-	Hä-	2
76G1	Hä-	Hä-	2
78G10	Hä-	Hä-	1

M49

Stamm-Nr.	Phänotyp 1. Selektion	Phänotyp Bestätigungsrounden	Anzahl integrierter Tn <i>Spc</i> -Elemente
6A8	H-	Col.-	2
6H1	H-	H-	1
9F9	H-	H-	1
14B10	MS- und H-	MS-	1
29E11	H-	MS-; H- und Col.-	2
30F5	H-	MS- und H-	1
32H3	H-	MS-; H- und Col.-	1
38E6	MS-	H- und Col.-	2
46D11	H-	MS-; H- und Col.-	Kein Signal
59C5	MS-	MS- und Col.-	2
61D2	H-	Col.-	2
63H7	H-	MS- und Col.-	2
65G12	H-	MS- und Col.+	1
65H1	H-	MS-; H- und Col.-	1

Fortsetzung Tab. 14:

M49

Stamm-Nr.	Phänotyp 1. Selektion	Phänotyp Bestätigungsrounden	Anzahl integrierter Tn <i>Spc</i> -Elemente
68B12	H-	MS-; H- und Col.-	2
68C8	H-	MS-; H- und Col.-	1
72G10	H-	H-	1
73B5	H-	MS- und H-	1
76B2	MS- und H-	MS-; H- und Col.-	1
76G10	H-	H- und Col.-	1
78B11	MS- und H-	MS- und Col.-	2
86D9	H-	MS- und Col.-	2
89F2	H-	MS- und Col.-	Kein Signal
90C11	H-	MS-; H- und Col.-	1
8B11	Hä-	Hä-	3
28B3	Hä-	Hä-	2
50C4	Hä-	Hä-	Kein Signal
57E3	Hä-	Hä-	1
67A11	Hä-	Hä-	1
71B8	Hä-	Hä-	2
90D2	Hä-	Hä-	2

6.3.2. Northern-Blot Ergebnisse

Zur Untersuchung des Expressionsprofils von *Spy49_1658c* in M49 591 wurden Northern-Blot-Analysen mit Gesamtzell-RNA aus der exponentiellen, Transitions- und stationären Wachstumsphase durchgeführt. Als Sonde dienten Digoxigenin-markierte DNA-Fragmente von *Spy49_1658c* und des unmittelbar stromaufwärts befindlichen Gens *Spy49_1659c*. In Abb. 33 wurde die Wachstumskurve der THY-batch-Kultur, aus der GAS-Zellen zur RNA-Isolierung gewonnen wurden, gezeigt. Zusätzlich wurde die gewonnenen RNA auf DNA-Kontaminationen mit Hilfe einer *Spy49_1660*-spezifischen PCR untersucht (s. Abb. 33 B)).

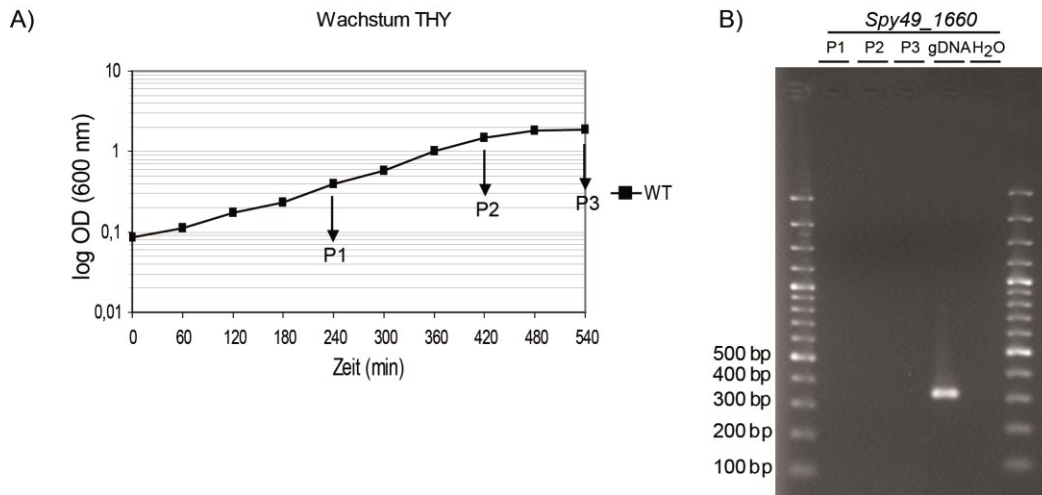


Abb. 33: RNA-Isolierung aus *S. pyogenes* M49 591 für eine Northern-Blot-Analyse zur Detektion von *Spy49_1658c* Transkripten.

A) Aus drei unterschiedlichen Wachstumsphasen wurden Zellen zur RNA-Gewinnung aus einer 100 ml Batch-Kultur in THY verwendet. RNA-Probe P1 stammte aus exponentiell wachsenden GAS-Zellen, P2 aus Zellen der Transitionsphase und P3 aus der stationären Phase. B) Eine *Spy49_1660* spezifische PCR mit Gesamt-RNA der Proben P1-P3 diente zum Nachweis von DNA-Kontaminationen. Als Positiv-Kontrolle wurde gDNA des WT M49 verwendet.

Das Kontrollexperiment zum Nachweis von gDNA in den isolierten RNA-Proben P1-P3 des WT M49 591 zeigte keine Spuren von DNA, da sich ausschliesslich unter Verwendung gDNA ein ca. 300 bp langes Nukleinsäure-Fragment mit *Spy49_1660*-spezifischen Primern amplifizieren ließ.

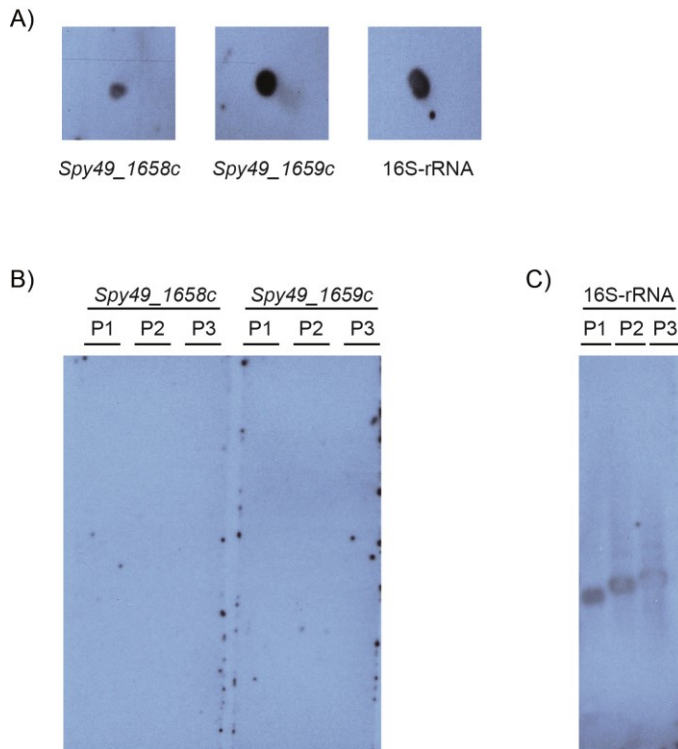


Abb. 34: Ergebnisse der Northern-Blot-Untersuchungen mit RNA-Proben P1-P3 des WT M49 591.

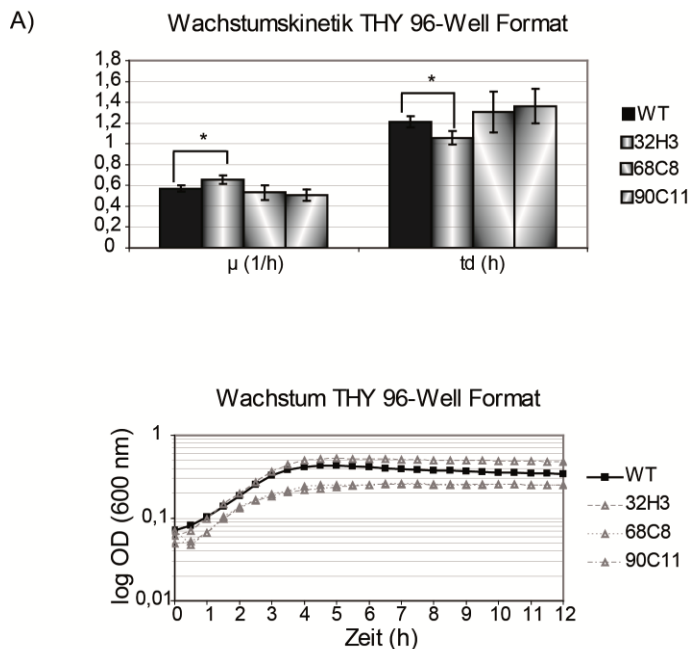
Als Sonden wurden Digoxigenin-markierte DNA-Abschnitte von *Spy49_1658c*, *Spy49_1659c* und 16S-rRNA verwendet. A) Überprüfung der Funktionalität der einzelnen Sonden. B) Auswertung des Northern-Blots durch Detektion hybridisierter Sonden-DNA für *Spy49_1658c* und *Spy49_1659c* mit 1 µg Gesamtzell-RNA des WT aus exponentieller (P1), Transitions- (P2) und stationärer (P3) Wachstumsphase. C) Kontrolle der Northern-Blot Bedingungen durch Verwendung einer 16S-rRNA Sonde sowie RNA-Proben P1-P3 des WT.

Unter Abb. 34 A) ist deutlich zu erkennen, dass die generierten Digoxigenin-markierten Sonden für *Spy49_1658c*, *Spy49_1659c* und 16S-rRNA funktionsfähig waren. Jedoch ließ sich im Northern-Blot mit Gesamtzell-RNA aus verschiedenen Wachstumsphasen des WT kein Sonden-Signal für *Spy49_1658c* und *Spy49_1659c* detektieren. Lediglich unter Verwendung der 16S-rRNA Sonde konnten Signale für die Gesamtzell-RNA aus der exponentiellen, Transitions- und stationären Wachstumsphase auf Röntgenfilm visualisiert werden. Eine Wiederholung der Northern-Analyse ergab erneut keine Signale für *Spy49_1658c* und *Spy49_1659c* aber ein Signal unter Verwendung der Kontrolsonde.

6.3.3. Wachstumskinetik *Spy49_1658c::TnSpc* Stämme 32H3, 68C8 und 90C11

Im Mittel besaß der WT eine Wachstumsrate μ (und Verdopplungszeit t_d) in THY und CDM von $\mu_{\text{THY}} = 0,57 \pm 0,03$ 1/h ($t_{d\text{THY}} = 1,21$ h $\pm 0,05$ h) und $\mu_{\text{CDM}} = 0,40 \pm 0,01$ 1/h ($t_{d\text{CDM}} = 1,74$ h $\pm 0,05$ h). Für 68C8 konnte $\mu_{\text{THY}} = 0,53 \pm 0,07$ 1/h ($t_{d\text{THY}} = 1,31$ h $\pm 0,20$ h) und

$\mu_{\text{CDM}} = 0,50 \pm 0,14$ 1/h ($\text{td}_{\text{CDM}} = 1,14 \text{ h} \pm 0,56 \text{ h}$) beobachtet werden. 90C11 besaß eine Wachstumsrate (und Verdopplungszeit) von $\mu_{\text{THY}} = 0,51 \pm 0,06$ 1/h ($\text{td}_{\text{THY}} = 1,36 \text{ h} \pm 0,16 \text{ h}$) und $\mu_{\text{CDM}} = 0,52 \pm 0,13$ 1/h ($\text{td}_{\text{CDM}} = 1,34 \text{ h} \pm 0,36 \text{ h}$). In den Medien THY und CDM konnten somit zw. WT und den Insertionsmutanten 68C8 und 90C11 keine signifikanten Unterschiede im Wachstumsverhalten beobachtet werden (Abb. 35). Für *Spy49_1658c::TnSpc* 32H3 wurde jedoch eine signifikant erhöhte μ und dem entsprechend auch eine signifikant verringerte td während des exponentiellen Wachstums in THY, mit $p < 0,05$, und in CDM, mit $p < 0,01$, beobachtet (Abb. 35). In THY belief sich die Wachstumsrate für 32H3 auf $\mu_{\text{THY}} = 0,66 \pm 0,04$ 1/h und die Verdopplungszeit auf $\text{td}_{\text{THY}} = 1,06 \text{ h} \pm 0,07 \text{ h}$. In CDM wurde eine mittlere Wachstumsrate von $\mu_{\text{CDM}} = 0,57 \pm 0,07$ 1/h und Verdopplungszeit von $\text{td}_{\text{CDM}} = 1,22 \text{ h} \pm 0,16 \text{ h}$ berechnet.



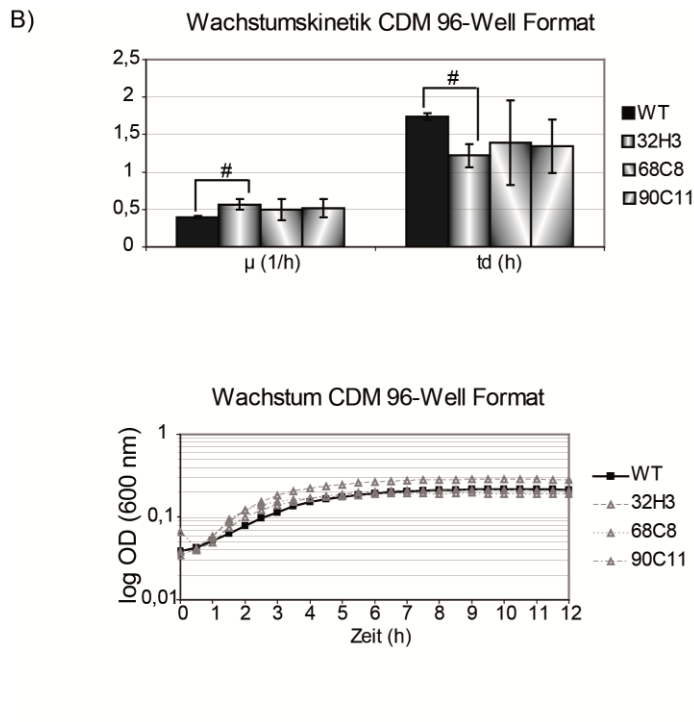


Abb. 35: Wachstumsverhalten im 96-Well Format der *Spy49_1658c::TnSpc* Stämme 32H3, 68C8 und 90C11 in den Medien THY und CDM.

Über 12 Stunden erfolgte die Erfassung der optischen Dichte bei 600 nm im Tecan Reader. Das Kultur-Volumen betrug 200 μ l. Als Blindwert diente das entsprechende Medium ohne Zellmaterial. Zur Berechnung von μ (1/h) und td (h) wurde der Bereich $t = 1$ h bis $t = 3$ h innerhalb der exponentiellen Wachstumsphase herangezogen. Die Anzahl biologischer Wiederholungen betrug $n = 4$.

In Tab. 15 wurden die berechneten Wachstumsparameter μ und td für den WT und die *Spy49_1658c::TnSpc* Mutanten 32H3, 68C8 und 90C11 für die einzelnen biologischen Wiederholungen in THY und CDM aufgelistet. Tab. 16 gibt die daraus resultierenden Mittelwerte und Standardabweichungen für μ und td in THY und CDM wieder.

Tab. 15: Einzelergebnisse der berechneten Wachstumsparameter μ (1/h) und td (h) für die Insertionsmutanten 32H3, 68C8 und 90C11.

Das Wachstum erfolgte im 96-Well Format in den Medien THY und CDM.

THY Stämme	μ (1/h)	td (h)
WT_A	0,610	1,136
WT_B	0,561	1,236
WT_C	0,558	1,242
WT_D	0,551	1,258
32H3_A	0,685	1,012
32H3_B	0,681	1,018
32H3_C	0,601	1,153
32H3_D	0,657	1,055
68C8_A	0,526	1,319

Fortsetzung Tab. 15:

THY		
Stämme	μ (1/h)	td (h)
68C8_B	0,592	1,170
68C8_C	0,574	1,209
68C8_D	0,432	1,605
90C11_A	0,514	1,349
90C11_B	0,425	1,630
90C11_C	0,556	1,247
90C11_D	0,511	1,356

CDM		
Stämme	μ (1/h)	td (h)
WT_A	0,410	1,691
WT_B	0,401	1,730
WT_C	0,384	1,807
WT_D	0,400	1,737
32H3_A	0,620	1,119
32H3_B	0,631	1,099
32H3_C	0,491	1,413
32H3_D	0,523	1,325
68C8_A	0,539	1,285
68C8_B	0,617	1,123
68C8_C	0,294	2,359
68C8_D	0,518	1,338
90C11_A	0,376	1,842
90C11_B	0,595	1,165
90C11_C	0,451	1,538
90C11_D	0,648	1,070

Tab. 16: Mittelwerte und Standardabweichungen der berechneten Wachstumsparameter μ (1/h) und td (h).

THY				
Stämme	MW μ (1/h)	STABW μ (1/h)	MW td (h)	STABW td (h)
WT	0,572	0,027	1,212	0,056
32H3	0,655	0,039	1,058	0,065
68C8	0,531	0,072	1,305	0,197
90C11	0,509	0,055	1,363	0,164

CDM				
Stämme	MW μ (1/h)	STABW μ (1/h)	MW td (h)	STABW td (h)
WT	0,398	0,011	1,741	0,048
32H3	0,566	0,070	1,220	0,155
68C8	0,498	0,139	1,391	0,563
90C11	0,516	0,126	1,344	0,355

6.3.4. Wachstumsparameter für M49 591 und *Spy49_1658c::TnSpc* 32H3, 68C8 und 90C11 zur Bestimmung Verbrauchsrate essentieller AS

Die Wachstumsraten μ (und td) für den WT und die Insertionsmutanten betrugen: $\mu_{WT} = 1,02$ 1/h ($td_{WT} = 0,68$ h); $\mu_{32H3} = 0,81$ 1/h ($td_{32H3} = 0,86$ h); $\mu_{68C8} = 0,91$ 1/h ($td_{68C8} = 0,77$); $\mu_{90C11} = 0,82$ 1/h ($td_{90C11} = 0,85$).

Abb. 36 A) stellt die berechneten Wachstumsparameter μ und td des WT und der *Spy49_1658c::TnSpc* Stämme sowie die Wachstumskurve und die pH-Änderung des CDM Mediums grafisch dar. Unter Abb. 36 B) wurde zusätzlich die Azidifizierungsrate nach dem 8-stündigen Wachstum in CDM dargestellt.

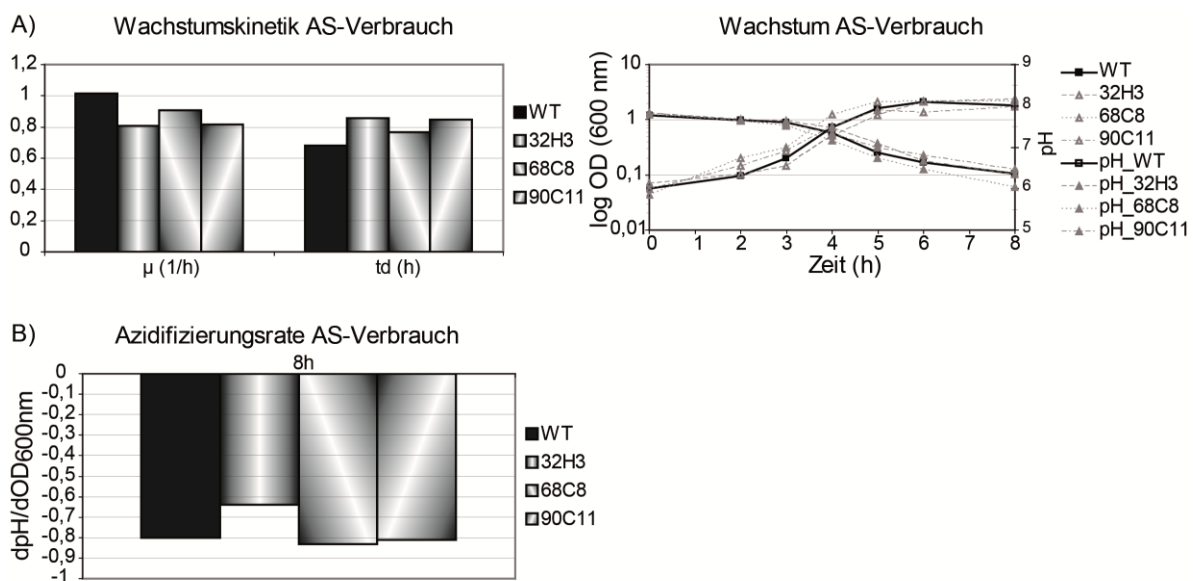


Abb. 36: Grafische Darstellung der berechneten Wachstumsparameter μ (1/h) und td (h) sowie der Azidifizierungsrate des WT M49 591 und der *Spy49_1658c::TnSpc* Stämme 32H3, 68C8 und 90C11.

Das Wachstum erfolgte in einer 100 ml batch-Kulturen in CDM. Unter A) wurden die Wachstumsraten μ (1/h), Verdopplungszeiten td (h) sowie zusätzlich die Wachstumskurven mit pH-Daten für jeden Meßpunkt angegeben. B) zeigt die berechneten Azidifizierungsraten nach dem 8-stündigen Wachstum.

Geringfügige Unterschiede im Wachstumsverhalten der CDM-batch-Kulturen des WT und der Transposonmutanten 32H3, 68C8 und 90C11 waren zu erkennen. Mit Werten für μ zwischen 0,8 bis 0,9 1/h besaßen alle Mutantenstämme eine geringere Wachstumsrate als der WT, dessen Wachstumsraten ca. 1,0 1/h betrug. Bei den Verdopplungszeiten kam der WT auf ca. 0,7 h während die *Spy49_1658c::TnSpc* Stämme Werte zwischen 0,8 h und 0,9 h erreichten.

Dagegen erzielten stationären batch-Kulturen des WT und der Mutantenstämme 68C8 und 90C11 Azidifizierungsraten von ca. -0,8 dpH/dOD_{600nm}. Abweichend davon kam 32H3 auf einen Wert von ca. -0,6 dpH/dOD_{600nm}.

Tab. 17 faßt die berechneten Wachstumsparameter μ , td und Azidifizierungsrate des WT und der Transposonstämme zusammen.

Tab. 17: Berechnete μ (1/h) und td (h) Werte sowie die Azidifizierungsraten der Stämme *Spy49_1658c::TnSpc* 32H3, 68C8 und 90C11 nach achtstündigem Wachstum in CDM.

Stamm	μ (1/h)	td (h)	dpH/dOD _{600nm}
WT	1,016	0,682	-0,801
32H3	0,810	0,856	-0,638
68C8	0,906	0,765	-0,832
90C11	0,818	0,847	-0,811

6.3.5. Veränderte Oberflächenhydrophobizität der *Spy49_1658c::TnSpc* Stämme 68C8 und 90C11

Neben der Oberflächenhydrophobizität der Deletionsmutante $\Delta Spy49_1658c$ wurde auch für die *Spy49_1658c::TnSpc* Stämme 32H3, 68C8 und 90C11 die Hydrophobizität der Zelloberfläche ermittelt (s. 3.9.). Für die Stämme 68C8 und 90C11 konnte ähnlich wie für die Deletionsmutante eine signifikant verringerte Hydrophobizität im Vergleich zum WT festgestellt werden (Abb. 37). Der WT besaß eine relative Oberflächenhydrophobizität von 56,92 (\pm 4,82) % und die Insertionsmutanten 68C8 von 37,01 (\pm 1,70) % und 90C11 von 32,87 (\pm 11,44) %. Für den *Spy49_1658c::TnSpc* Stamm 32H3 wurde eine relative Oberflächenhydrophobizität von 53,61 (\pm 15,27) % berechnet. Damit wich diese nicht-signifikant vom WT ab (Abb. 37).

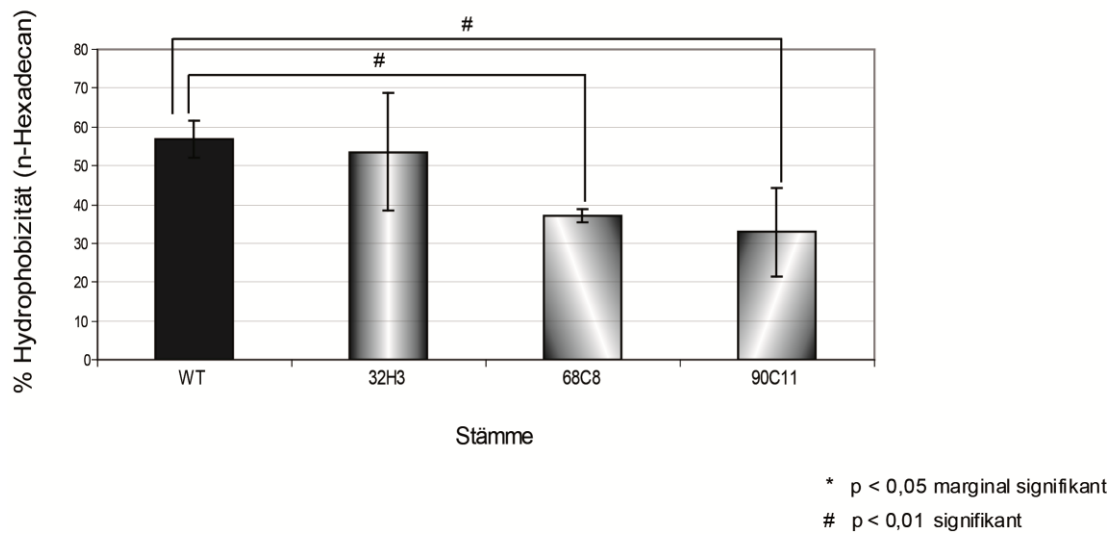


Abb. 37: Grafische Gegenüberstellung der berechneten Oberflächenhydrophobizität des WT M49 591 sowie der Transposonmutanten 32H3, 68C8 und 90C11.

Die Oberflächenhydrophobizität wurde prozentual zu n-Hexadecan berechnet. Anzahl der unabhängigen Wiederholungen betrug n = 4.

6.3.6. Multiplikationsfaktor des WT M49 591 und $\Delta Spy49_1658c$ in DMEM+GlutaMAX™ während Adhäsions/Internalisierungsassay mit HaCaT-Zellen

Um Defizite im Wachstum des WT M49 591 und der Deletionsmutante $\Delta Spy49_1658c$ während des Versuchs zur Bestimmung des Adhäsions/Invasionspotentials an/in HaCaT-Zellen auszuschließen, wurde der Multiplikationsfaktor für beide Stämme während der zweistündigen Koinkubation berechnet. Die Mittelwerte des Multiplikationsfaktors beider Stämme zeigten keine signifikanten Unterschiede zueinander (s. Abb. 38). Für den WT wurde ein Wert von 18,17 (\pm 6,42) und für $\Delta Spy49_1658c$ von 11,30 (\pm 1,37) ermittelt. Abweichungen im Adhäsions- bzw. Invasionsverhalten zw. WT und Mutante beruhten damit nicht auf Unterschiede im Wachstumspotential beider Stämme.

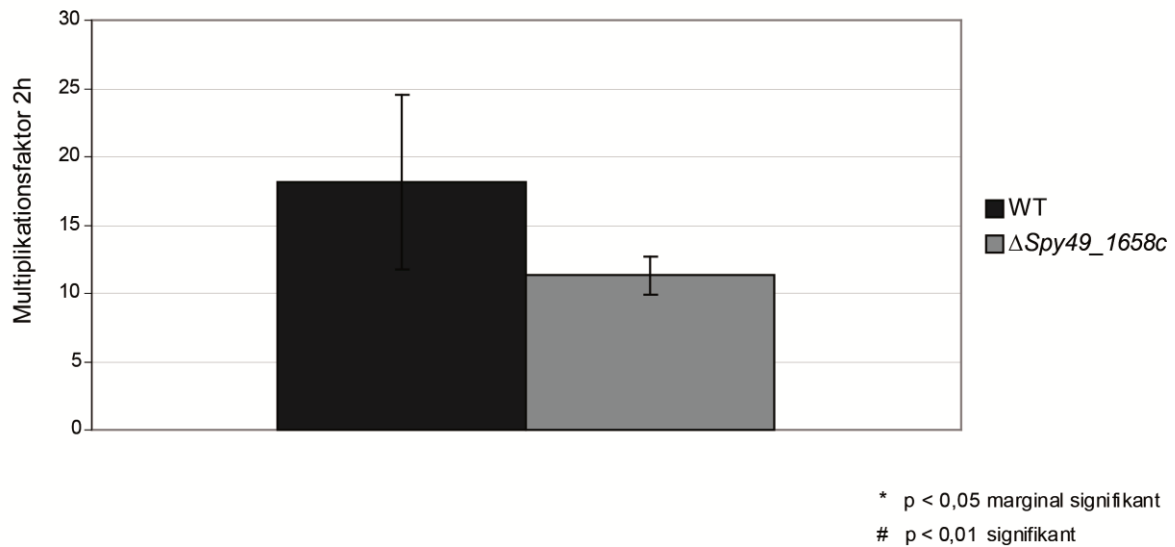


Abb. 38: Vergleich des Replikationspotentials des WT M49 591 und der Deletionsmutante $\Delta Spy49_1658c$ für ein zweistündiges Wachstum in DMEM+GlutaMAX™ mit 10 % hiFKS.

Während des Versuchs zur Bestimmung der Adhäsions-/Invasionsfähigkeit beider Stämme an HaCaT-Zellen dienten $KBE_{t=0}$ zu Beginn und $KBE_{t=2}$ nach Koinkubation zur Berechnung des Multiplikationsfaktors. Die Anzahl unabhängiger Wiederholungen betrug $n = 4$.

Die Mittelwerte des Multiplikationsfaktors beider Stämme zeigten keine signifikanten Unterschiede zueinander (s. Abb. 38). Für den WT wurde ein Wert von 18,17 ($\pm 6,42$) und für $\Delta Spy49_1658c$ von 11,30 ($\pm 1,37$) ermittelt.

6.3.7. Vermehrungspotential von $\Delta Spy49_1658c$ in DMEM+GlutaMAX™+Pyruvat während des Phagozytoseassay mit J774A.1 entsprach M49 591

Zum Ausschluss von Wachstumsunterschieden zw. den Stämmen M49 591 und $\Delta Spy49_1658c$ im verwendeten Zellkulturmedium DMEM+GlutaMAX™+Pyruvat wurde der Multiplikationsfaktor nach 30 min ermittelt. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zw. beiden GAS-Stämmen festgestellt werden. Das Replikationpotential des WT betrug im Durchschnitt 1,95 ($\pm 0,84$) und das der Deletionsmutante 1,61 ($\pm 0,12$). Die grafische Gegenüberstellung der Daten ist in Abb. 39 zu sehen.

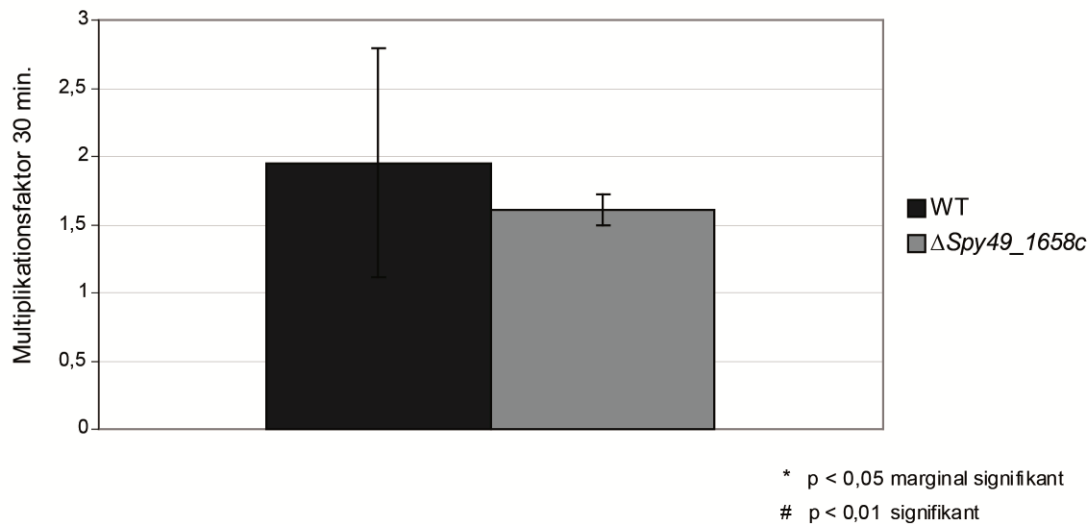


Abb. 39: Wachstumspotential des WT M49 591 und der Deletionsmutante $\Delta Spy49_1658c$ während des Phagozytoseassays mit murinen Monozyten-Makrophagen J774A.1.

Das Wachstum erfolgte in DMEM+GlutaMAX™+Pyruvat mit 10% hiFKS. Beide GAS-Stämme wurden für 30 min im Zellkulturmedium ohne eukaryotische Zellen inkubiert. Anschließend wurde der Multiplikationsfaktor aus $KBE_{t=30min}/KBE_{t=0}$ berechnet. Anzahl unabhängiger Wiederholungen n = 4.

6.4. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schematische Darstellung des Vektors pMGC57- <i>spc</i> nach Lyon <i>et al.</i> 1998.	9
Abb. 2: Methodische Zusammenfassung der „SiteFinding“- und Nested-PCR nach Tan <i>et al.</i>	29
Abb. 3: Southern-Blot Analysen zufällig ausgewählter Tn <i>Spc</i> Insertionsmutanten.	45
Abb. 4: Exemplarische Darstellung von M49 Tn <i>Spc</i> -Mutanten, die von einer 96-Well-Platte auf verschiedene Medien überimpft wurden.	47
Abb. 5: Southern-Blot der Tn <i>Spc</i> -Mutanten mit einem Tn <i>Spc</i> -Element.	52
Abb. 6: Wachstumsverhalten von M18 Tn <i>Spc</i> -Mutanten auf Stress-Agarplatten.	54
Abb. 7: Wachstumsverhalten von M49 Tn <i>Spc</i> -Mutanten auf Stress-Agarplatten.	57
Abb. 8: Elektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte von Ansätzen mit <i>Spy49_1658c</i> bzw. <i>Spy49_1659c</i> -spezifischen Primern mit gDNA der M49 Tn <i>Spc</i> -Stämme 32H3, 68C8 und 90C11.	62
Abb. 9: Nachweis des funktionellen Verlustes von <i>Spy49_1658c</i> auf Transkriptionsebene in den Insertionsmutanten 32H3, 68C8 und 90C11.	64
Abb. 10: Prognostizierte Sekundärstrukturen von „mfold“.	66

Abb. 11: Schematische Darstellung des Genombereiches von <i>Spy49_1657</i> bis <i>Spy49_1659c</i>	67
Abb. 12: Untersuchungen zur Bestätigung des polycistronischen Transkriptes bestehend aus <i>Spy49_1658c</i> und <i>Spy49_1659c</i>	68
Abb. 13: Plasmidkarten zur Deletion von <i>Spy49_1658c</i>	70
Abb. 14: Kontroll-Verdau von pASK-IBA3c-ko <i>Spy49_1658c</i>	71
Abb. 15: Auftrennung amplifizierter Genprodukte von zwei potentiellen Δ <i>Spy49_1658c</i> Klonen und dem WT zur Bestätigung der gerichteten Deletion durch „double-crossover“....	72
Abb. 16: Kontrolluntersuchungen zur gerichteten Deletion von <i>Spy49_1658c</i> in Δ <i>Spy49_1658c</i> auf RNA-Ebene.	73
Abb. 17: Wachstumsverhalten von WT M49 591 und Δ <i>Spy49_1658c</i> auf Stress-Agarplatten.	75
Abb. 18: Zusammenstellung der ermittelten Parameter μ (1/h), td (h) und Azidifizierungsraten für das Wachstum von WT M49 591 und Δ <i>Spy49_1658c</i>	78
Abb. 19: Der Verbrauch essentieller und nicht-essentieller Aminosäuren durch den WT M49 591 und die <i>Spy49_1658c::TnSpc</i> Stämme 32H3, 68C8 und 90C11.	82
Abb. 20: Prozentuale Überlebensraten der Stämme M49 591 und Δ <i>Spy49_1658c</i> in Gegenwart von MS, H ₂ O ₂ oder Colistin.	84
Abb. 21: Wachstumsverhalten des WT M49 591 und der Deletionsmutante Δ <i>Spy49_1658c</i> in Gegenwart von MS und verschiedener AMP.	89
Abb. 22: Prozentuale Oberflächenhydrophobizität der Stämme M49 591 und Δ <i>Spy49_1658c</i> in Bezug zu n-Hexadecan.	92
Abb. 23: Adhärenz/Internalisierungsverhalten von WT M49 591 und Δ <i>Spy49_1658c</i> an humane Keratinozyten HaCaT.	93
Abb. 24: Überlebensfähigkeit der Stämme M49 591 und Δ <i>Spy49_1658c</i> nach drei Stunden in Vollblut.	95
Abb. 25: Phagozytoseassay mit murinen Monozyten-Makrophagen J774A.1 und <i>S. pyogenes</i> M49 591 bzw. Δ <i>Spy49_1658c</i>	96
Abb. 26: Southern-Blot einer Auswahl an M18 <i>TnSpc</i> -Stämmen.	136
Abb. 27: Southern-Blot von <i>TnSpc</i> -Mutanten des Serotyps M18 mit einer veränderten Sensitivität gegenüber H ₂ O ₂ u./o. MS u./o. Col.	137
Abb. 28: Southern-Blot der M18 <i>TnSpc</i> -Mutante 44C3.	137
Abb. 29: Southern-Blot-Analyse von <i>TnSpc</i> -Mutanten des Serotyps M18 und M49.	138
Abb. 30: Southern-Analyse von <i>TnSpc</i> -Insertionsmutanten des Serotyps M18 und M49. ...	139

Abb. 31: Southern-Blot von M18 und M49 Tn <i>Spc</i> -Mutanten zur Bestimmung der Anzahl integrierter Transposonelemente.	140
Abb. 32: Untersuchung der Anzahl eingebauter Transposonelemente ins Genom von M49:: <i>TnSpc</i> Stämmen.	141
Abb. 33: RNA-Isolierung aus <i>S. pyogenes</i> M49 591 für eine Northern-Blot-Analyse zur Detektion von <i>Spy49_1658c</i> Transkripten.	144
Abb. 34: Ergebnisse der Northern-Blot-Untersuchungen mit RNA-Proben P1-P3 des WT M49 591.	145
Abb. 35: Wachstumsverhalten im 96-Well Format der <i>Spy49_1658c</i> :: <i>TnSpc</i> Stämme 32H3, 68C8 und 90C11 in den Medien THY und CDM.	147
Abb. 36: Grafische Darstellung der berechneten Wachstumsparameter μ (1/h) und t_d (h) sowie der Azidifizierungsrate des WT M49 591 und der <i>Spy49_1658c</i> :: <i>TnSpc</i> Stämme 32H3, 68C8 und 90C11.	149
Abb. 37: Grafische Gegenüberstellung der berechneten Oberflächenhydrophobizität des WT M49 591 sowie der Transposonmutanten 32H3, 68C8 und 90C11.	151
Abb. 38: Vergleich des Replikationspotentials des WT M49 591 und der Deletionsmutante Δ <i>Spy49_1658c</i> für ein zweistündiges Wachstum in DMEM+GlutaMAX™ mit 10 % hiFKS.	152
Abb. 39: Wachstumspotential des WT M49 591 und der Deletionsmutante Δ <i>Spy49_1658c</i> während des Phagozytoseassays mit murinen Monozyten-Makrophagen J774A.1.	153

6.5. Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Übersicht der Plasmide, ihre Herkunft und Charakteristika.	11
Tab. 2: Übersicht der Nährmedien.	12
Tab. 3: Zusammensetzung der Pufferlösungen.	13
Tab. 4: Übersicht verwendeter Primer, ihrer Sequenzen sowie weitere wichtige Charakteristika.	21
Tab. 5: Zusammensetzung von 10x MOPS Puffer sowie Lösung 1 und 2.	26
Tab. 6: Zusammensetzung der zu Southern/Northern-Blot Analysen eingesetzten nicht-kommerziellen Pufferlösungen.	33
Tab. 7: Übersicht der verwendeten Stresssubstanzen.	38
Tab. 8: Übersicht über Anzahl an Tn <i>Spc</i> -Mutanten mit abweichender Toleranz gegenüber MS und H ₂ O ₂ im Vergleich zum WT.	48

Tab. 9: Gegenüberstellung der beobachteten Phänotypen ausgewählter M18::Tn <i>Spc</i> und M49::Tn <i>Spc</i> Stämme.....	59
Tab. 10: Zusammenfassung der beobachteten Phänotypen definierter Zelldichten, Position sowie Genbeschreibung der Transposoninsertionsstelle.....	60
Tab. 11: Gegenüberstellung der berechneten mittleren Wachstumsparameter μ , t_d und Azidifizierungsraten aus Batch-Kulturen des WT und $\Delta Spy49_1658c$	78
Tab. 12: Prozentualer Anteil des Vermehrungspotentials des WT M49 591 und der Deletionsmutante $\Delta Spy49_1658c$ unter MS- und AMP-Stress.....	90
Tab. 13: Zusammensetzung und Pipettierschema der zur Herstellung von CDM verwendeten Lösungen.....	134
Tab. 14: Übersicht der mittels Southern-Blot untersuchten M18 und M49 Tn <i>Spc</i> -Mutanten.....	141
Tab. 15: Einzelergebnisse der berechneten Wachstumsparameter μ (1/h) und t_d (h) für die Insertionsmutanten 32H3, 68C8 und 90C11.....	147
Tab. 16: Mittelwerte und Standardabweichungen der berechneten Wachstumsparameter μ (1/h) und t_d (h).	148
Tab. 17: Berechnete μ (1/h) und t_d (h) Werte sowie die Azidifizierungsraten der Stämme <i>Spy49_1658c</i> ::Tn <i>Spc</i> 32H3, 68C8 und 90C11 nach achtstündigem Wachstum in CDM.	150

6.6. Publikationsliste

6.6.1. Veröffentlichung in Fachzeitschriften

Sugareva V., Arlt R., Fiedler T., Riani C., Podbielski A., Kreikemeyer B. (2010): Serotype- and strain- dependent contribution of the sensor kinase CovS of the CovRS two-component system to *Streptococcus pyogenes* pathogenesis. BMC Microbiol. 10: 34

Fiedler T., Kreikemeyer B., Sugareva V., Redanz S., Arlt R., Standar K., Podbielski A. (2010): Impact of the *Streptococcus pyogenes* Mga regulator on human matrix protein binding and interaction with eukaryotic cells. Int J Med Microbiol 300 (4): 248-258

6.6.2. Tagungsbeiträge (Poster und Vorträge)

R. Arlt, V. Sugareva, A. Bütow, B. Kreikemeyer (2010): Characterization of transposon-based *S. pyogenes* mutants with effects on oxidative stress tolerance. Symposium der DGHM-Fachgruppen Mikrobielle Pathogenität (Vortrag)

V. Sugareva, R. Arlt, K. Kriebel, A. Podbielski, B. Kreikemeyer (2010): Isolation and characterization of *Streptococcus pyogenes* biofilm mutants. Jahrestagung DGHM/VAAM Hannover (Poster)

R. Arlt, V. Sugareva, A. Bütow, N. Siemens, B. Kreikemeyer (2010): Identification of novel virulence factors of *S. pyogenes* serotype M18 and M49. Jahrestagung von DGHM/VAAM Hannover (Poster)

R. Arlt, V. Sugareva, A. Podbielski, B. Kreikemeyer (2009): Establishment of a screening method for mutant libraries of *S. pyogenes* to identify novel virulence factors. Jahrestagung DGHM Göttingen (Poster)

V. Sugareva, M. Brochet, R. Arlt, I. Haddad, P. Glaser, R. Münch, A. Podbielski, B. Kreikemeyer (2009): High-throughput screening of mutant library of *S. pyogenes* M49 for identification of novel virulence determinants. Jahrestagung DGHM Göttingen (Poster)

V. Sugareva, R. Arlt, C. Riani, A. Podbielski, B. Kreikemeyer (2008): Serotype-dependent contribution of the CovRS two-component system on *Streptococcus pyogenes* biofilm formation and adherence to human keratinocytes. Jahrestagung DGHM Dresden (Poster)

R. Arlt, V. Sugareva, A. Podbielski, B. Kreikemeyer (2008): Generation of mutant banks in serotype M18 and M49 of *Streptococcus pyogenes* for identification of novel virulence determinants. Jahrestagung DGHM Dresden (Poster)

P. Schmidt, O. Bader, R. Arlt, U. Gross, M. Weig (2008): Characterization of the cwp1 structural cell wall protein family in *Candida glabrata*. Jahrestagung DGHM Dresden (Poster)

6.7. Selbstständigkeitserklärung

Ich versichere hiermit an Eides statt, dass ich vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt und ohne fremde Hilfsmittel verfasst habe. Ich habe keine, außer den von mir angegebenen, Hilfsmittel und Quellen verwendet. Inhaltlich und wörtlich entnommene Stellen aus den benutzten Werken habe ich als solche kenntlich gemacht.

Regina Arlt

Rostock, 12.02.2015